

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos



Jose Antonio Mendiola León

Tesis doctoral
Abril de 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos

Memoria presentada por:

Jose Antonio Mendiola León

Para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Elena Ibáñez Ezequiel
(Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC)

Dr. Fco. Javier Señoráns Rodríguez
(Universidad Autónoma de Madrid)



DRA. M^a ELENA IBÁÑEZ EZEQUIEL, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CSIC) Y DR. FCO. JAVIER SEÑORÁNS RODRÍGUEZ, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID,

CERTIFICAN,

Que la presente memoria titulada: **“Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos”**, presentada por **Jose Antonio Mendiola León**, Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC y en la Sección departamental de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste firmamos el presente certificado a 14 de Abril de 2008

Dra. M^a Elena Ibáñez Ezequiel

Dr. Fco. Javier Señoráns Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

El trabajo¹ reflejado en la presente memoria ha sido realizado a lo largo de varios años, durante ese periodo es mucha la gente que ha ido dejando su impronta, gente que ha colaborado positiva o negativamente (que de todo hay) a que esta tesis haya ido saliendo a delante, aunque a veces sólo haya sido aportando su compañía.

Antes de nada quería dar las gracias a tres personas: mis padres y Bea. A mis padres por enseñarme y transmitirme el valor del trabajo. A Bea ([♫]*Have I told you lately that I love you?*[♫]) sin cuya ayuda, comprensión, cariño y compañía ni este tocho ni yo seríamos lo que somos. Vuestra ayuda ha sido fundamental en todo este tiempo y aunque sé que no será lo bastante agradecida simplemente con estas líneas, quiero que ahí queden.

Ya en el plano científico, al primero que quisiera mostrar mi agradecimiento es Javier Tabera (ya ves Javier, a veces no todo son mentiras), alguien que ha compartido sus enseñanzas científicas, artísticas, filosóficas... Como ya dije en otra ocasión: gran profesor y mejor persona.

A mis directores de tesis, Elena Ibáñez y Javier Señoráns. Con sus dos estilos distintos de enfocar y realizar el trabajo y han conseguido que la memoria que ahora tienes entre manos sea lo que es.

Dado que este trabajo se ha llevado a cabo “a caballo” entre el Instituto de Fermentaciones Industriales y la Universidad Autónoma de Madrid, quisiera agradecer la acogida recibida en sendos lugares por los “capos” de ambos grupos de investigación, Alejandro Cifuentes y Guillermo Reglero. Así como a los directores de Dpto. de Química-Física de la UAM (Miguel Paniagua) y de Caracterización de Alimentos del IFI (M^a Victoria Moreno)

Al haber hecho el trabajo *entre dos aguas* es mucha la gente con la que he currado y compartido cafés. A todos vosotros gracias por hacer más agradables las jornadas de trabajo, ha sido un verdadero placer compartir el tiempo y el espacio (muchas veces escaso) con vosotros

A “Los Otros”, cinematográfico nombre para recordar a Laura, Santi, Pilu y Sofía. Nenes, algo habréis hecho para estar aquí (y encima juntos) pese a quien pese.

A Owen Catchpole y toda la buena gente (kiwis o no) que conocí durante mi estancia en Nueva Zelanda, Marilyn, Maria Therese, Nicky, John, Wayne, Steve... I promise, someday, I'll be back.

Teniendo en cuenta mis acostumbrados olvidos seguro que no me he acordado de alguien, no por rencor ni por desagrado, es simplemente despiste.

De los que no me olvido es de la gente de la FJI-Precarios, sin cuyo esfuerzo y presión las condiciones laborales del personal investigador en las primeras etapas serían bastante peores.

Como no, a mi familia y amigos, que aunque no acaban de enterarse qué leches estoy haciendo, siempre están ahí para lo que haga falta.

Pero no quería cerrar este apartado sin recordar a dos personas que seguro se hubieran sentido orgullosas de leer sus nombres aquí, pero desafortunadamente no podrán verlos. Estoy hablando de mis abuelos Julián y Fidel. Sinceramente, ¡Va por vosotros!

GRACIAS A TODOS

Jose A. Mendiola, abril de 2008

[♫] and more, much more than this, I did it my way [♫]

¹ Este trabajo ha sido financiado dentro del programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación.

*Lo siento, pero no quiero ser emperador. No es lo mío.
No quiero gobernar ni conquistar a nadie. Me gustaría ayudar a todo el mundo.
En este mundo hay sitio para todos, la buena tierra es rica y
puede proveer a todos (...) Luchemos por un mundo de la razón,
un mundo en el que la ciencia y el progreso lleven la felicidad a todos nosotros.*

Charles Chaplin (1940) "El gran dictador"

ABREVIATURAS

AA _____	actividad antioxidante
Abs _____	Absorbancia
ABTS _____	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)
APCI _____	Ionización química a presión atmosférica
ASE _____	Extracción acelerada con disolventes
d.i. _____	Diámetro interno
DAD _____	Detector de haz de diodos
DAG _____	Diacilgliceroles
DMSO _____	Dimetil sulfóxido
DHA _____	Ácido docsaheptanoico
DPA _____	Ácido docosapentaenoico
DPPH _____	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ELSD _____	Dectector evaporativo de dispersión de luz
EPA _____	Ácido eicosapentaenoico
ESI _____	Electrospray
FFA _____	Ácidos grasos libres
FID _____	Detector de ionización de llama
GC _____	Cromatografía de gases
GLA _____	Acido g-linolenico
GRAS _____	Compuesto generalmente considerado seguro
HPLC _____	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
L-L _____	Extracción líquido-líquido
LIF _____	Fluorescencia inducida por láser
MAG _____	Monoacilgliceroles
MBC _____	Concentración mínima bactericida
MFC _____	Concentración mínima fungicida
MIC _____	Concentracion minima inhibitoria
MLR _____	Regresión lineal múltiple
MS _____	Espectrometría de masas
MS/MS _____	Espectrometría de masas en tandem
MTBE _____	Metil-terc-butil éter
PLE _____	Extracción con disolventes presurizados
PUFA _____	Acido graso poliinsaturado
RP-HPLC _____	Cromatografía de líquidos en fase inversa
RSD _____	Desviación estándar residual
SFE _____	Extracción con fluidos supercríticos
TAG _____	Triacilgliceroles
TEAC _____	Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox
TIC _____	Cromatograma de iones totales
TLC _____	Cromatografía en capa fina
UV-Vis _____	Ultravioleta/Visible

RESUMEN

En la presente Memoria se recogen los resultados más relevantes obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, en la que se ha estudiado la combinación de una tecnología limpia de extracción, como la Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE) junto con técnicas de análisis para la obtención y caracterización de potenciales ingredientes alimentarios funcionales procedentes de fuentes naturales, como las microalgas. El trabajo llevado a cabo se ha centrado en tres especies de microalgas, un alga verde-azulada del género *Cyanobacterium*, *Spirulina platensis*, un alga verde, *Dunaliella salina*, y una diatomea, *Chaetoceros muelleri*. Se resumen a continuación los aspectos más destacados de este trabajo.

Así, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de extracción mediante SFE para la obtención de extractos de *Spirulina platensis* con alta actividad antioxidante y buen rendimiento, empleando para ello un diseño experimental. Las condiciones óptimas proporcionadas por el diseño fueron: CO₂ y etanol como agente extractante, 78 bar y 55 °C. Para llevar a cabo la caracterización química de los extractos, se desarrollaron nuevos métodos basados en el empleo de cromatografía líquida acoplada a detección con diodo array (HPLC-DAD) y espectrometría de masas (HPLC-MS), así como métodos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La caracterización funcional se dirigió hacia el estudio de la capacidad antioxidante de los extractos (empleando el método de captación de radicales DPPH y el de autooxidación del ácido linoleico), así como a la medida de su potencial actividad antimicrobiana frente a varios tipos de microorganismos.

En relación a la microalga *Dunaliella salina*, también se optimizó la extracción por SFE de compuestos antioxidantes y/o antimicrobianos. Teniendo en cuenta el interés de los distintos isómeros de β-caroteno presentes en esta microalga y su distinta contribución a la capacidad antioxidante global de los extractos, se desarrolló un método de HPLC-DAD para la separación y cuantificación de los mismos y se estudió su influencia en la actividad antioxidante mediante técnicas estadísticas. En relación a la potencial actividad antimicrobiana de los extractos, se observó una importante actividad bactericida y se estudió por GC-MS la composición química de los extractos con el objetivo de identificar los compuestos responsables de dicha actividad; en este sentido se describió, por primera vez en este trabajo, la presencia de un derivado indólico posible responsable de la elevada actividad de alguno de los extractos.

Por último se estudió la capacidad del CO₂ en condiciones supercríticas para obtener extractos con actividad antimicrobiana de la microalga *Chaetoceros muelleri*. Los resultados mostraron una gran influencia de la densidad de extracción sobre los rendimientos obtenidos aunque fueron relativamente bajos en todas las condiciones debido a la pared celular que poseen las microalgas diatomeas. Mediante cromatografía líquida con detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD) y cromatografía de gases se pudo establecer un perfil lipídico de los extractos del que se desprende que su actividad antimicrobiana está directamente relacionada con su contenido en ácido docosapentaenoico y triglicéridos e inversamente relacionada con su contenido en colesterol.

ENGLISH SUMMARY

In this PhD Thesis, the main results obtained from the combined use of Supercritical Fluid Extraction (SFE) and analytical techniques to obtain and characterize potential functional ingredients from natural sources, suitable for the food industry, are presented. The blue-green alga *Spirulina platensis* (Cyanobacterium), the green microalga *Dunaliella salina* and the diatom *Chaetoceros muelleri* were selected as natural sources of functional ingredients in this study.

SFE extraction conditions were optimized by means of an experimental design to obtain *Spirulina platensis* extracts with good antioxidant activity and high yields. The best extraction conditions consisted of CO₂ plus ethanol at 78 bar and 55 °C. The chemical characterization was carried out by developing new methods based in liquid chromatography coupled to diode array detection (HPLC-DAD) and mass spectrometry (HPLC-MS) and gas chromatography coupled to MS (GC-MS). In order to obtain a functional characterization of extracts, two methods of antioxidant activity were used, DPPH radical scavenging and linoleic acid autooxidation. The antimicrobial activity against several strain of microorganisms was also tested.

As for *Dunaliella salina* microalga, the extraction process was also optimized to obtain extracts with good antioxidant activity and high yields. Considering the interest of different carotenoid isomers in this microalgae and their expected different contribution to the global antioxidant activity, a specific method to analyze carotenoid isomers was developed based on HPLC-DAD. Also, a statistical study was performed to determine the influence of different isomers in the measured antioxidant activity. The antimicrobial activity of the *Dunaliella* extracts was also studied. Results showed a potent activity against bacteria. GC-MS analysis of the extracts was performed with the goal to determine the compounds responsible of such activity; in this sense, an indolic derivative was identified and described for the first time in this microalgae, and therefore was suggested as responsible of the high antimicrobial activity shown by some extracts.

The last study dealt with the ability of supercritical CO₂ to obtain antimicrobial extracts from the diatom *Chaetoceros muelleri*. Results showed high influence of density on extraction yield, but yields obtained were relatively low due to the siliceous cell wall typical from diatom microalgae. By means of liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) and gas chromatography (GC-FID), it was possible to establish the lipidic profile of the extracts. From these profiles, it could be concluded that the antimicrobial activity was highly influenced by the content of docosapentaenoic acid and triglycerides and negatively correlated with its content in cholesterol.

Índice general

I.	Introducción.....	1
1.	Presentación y objetivos	3
2.	Introducción.....	5
2.1.	Fluidos supercríticos	5
2.1.1.	Generalidades sobre los fluidos supercríticos.....	5
2.1.2.	Fluidos supercríticos para la industria alimentaria	7
2.2.	Extracción con fluidos supercríticos (SFE).....	8
2.2.1.	Legislación.....	8
2.2.2.	Equipamiento básico para la extracción supercrítica	10
2.2.3.	Aplicaciones a escala industrial.....	10
2.2.4.	Aplicaciones a escala de laboratorio.....	11
2.3.	Otras aplicaciones de los fluidos supercríticos	12
2.4.	Ingredientes alimentarios con propiedades funcionales.....	14
2.4.1.	Antioxidantes.....	15
2.4.2.	Antimicrobianos	18
2.4.3.	Reglamento CE sobre nuevos alimentos.....	19
2.5.	Microalgas	20
2.5.1.	Spirulina platensis.....	20
2.5.2.	Dunaliella salina	24
2.5.3.	Chaetoceros muelleri	26
2.5.4.	Antecedentes de extractos de microalgas	28
2.5.5.	SFE y microalgas.....	29
3.	Bibliografía.....	32
II.	Optimización de la extracción de tocoferol de Spirulina mediante SFE.....	39
1.	Introducción.....	41
1.1.	Objetivos y plan de trabajo	43
2.	Materiales y métodos.....	44
2.1.	Muestras y reactivos	44
2.2.	Planta piloto de extracción supercrítica	44
2.3.	Metodología de extracción.....	46
2.4.	Análisis químico de tocoferoles	48
3.	Resultados y discusión.....	49
3.1.	Rendimiento de extracción	50
3.2.	Extracción de vitamina E	53
4.	Conclusiones.....	57
5.	Bibliografía.....	58
III.	Caracterización química y funcional de extractos supercríticos de <i>Spirulina platensis</i>	61
1.	Introducción.....	63
1.1.	Objetivos y plan de trabajo	64
2.	Materiales y métodos.....	65
2.1.	Muestras y reactivos	65
2.2.	Extracción supercrítica.....	65
2.3.	Determinación de la actividad funcional.....	65
2.3.1.	Actividad antioxidante.....	65
2.3.2.	Medida de la actividad antimicrobiana	67
2.4.	Caracterización química de los extractos	68
2.4.1.	Cromatografía en capa fina (TLC).....	68
2.4.2.	Análisis de pigmentos mediante HPLC-DAD	69
2.4.3.	Análisis de los extractos mediante HPLC-MS.....	69
2.4.4.	Cuantificación de ácidos grasos.....	70
3.	Resultados y discusión.....	71
3.1.	Actividad antimicrobiana.....	71
3.2.	Actividad antioxidante	74
3.2.1.	Captación de radicales DPPH	74
3.2.2.	Autooxidación del ácido linoleico	75
4.	Conclusiones.....	87
5.	Bibliografía.....	88

IV.	Obtención y caracterización de extractos supercríticos de <i>Dunaliella salina</i> con potencial actividad antioxidante	91
1.	Introducción	93
1.1.	Objetivos y plan de trabajo	95
2.	Materiales y métodos	96
2.1.	Muestras y reactivos	96
2.2.	Actividad antioxidante (TEAC)	97
2.3.	Extracciones con CO ₂	98
2.4.	Condiciones cromatográficas	100
2.5.	Análisis estadístico	101
3.	Resultados y discusión	101
3.1.	Optimización de las condiciones de extracción	101
3.2.	Actividad antioxidante	103
4.	Conclusiones	106
5.	Bibliografía	107
V.	Actividad antimicrobiana en extractos sub y supercríticos de <i>Dunaliella salina</i>	111
1.	Introducción	113
1.1.	Objetivos y plan de trabajo	113
2.	Materiales y métodos	114
2.1.	Muestras y reactivos	114
2.2.	Metodología de extracción	114
2.3.	Medida de la actividad antimicrobiana	114
2.4.	Caracterización química: GC-MS	115
2.4.1.	Análisis de la fracción volátil	115
2.4.2.	Análisis de ácidos grasos	116
3.	Resultados y discusión	116
3.1.	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Dunaliella</i>	116
3.2.	Análisis de ácidos grasos en los extractos	119
3.3.	Análisis de la fracción volátil de los extractos	120
4.	Conclusiones	123
5.	Bibliografía	124
VI.	Obtención de extractos supercríticos de <i>Chaetoceros muelleri</i> . Caracterización de su actividad antimicrobiana	127
1.	Introducción	129
1.1.	Objetivos y plan de trabajo	130
2.	Materiales y métodos	131
2.1.	Obtención de microalgas	131
2.2.	Reactivos	131
2.3.	Extracción supercrítica	131
2.4.	Análisis del material lipídico	132
2.4.1.	HPLC-ELSD	132
2.4.2.	GC-FID	132
2.5.	Medida de la actividad antimicrobiana	133
2.6.	Análisis estadístico	133
3.	Resultados y discusión	133
3.1.	Extracción supercrítica	133
3.2.	Actividad antimicrobiana	135
3.3.	Composición lipídica de los extractos	136
3.4.	Análisis estadístico	138
4.	Conclusiones	139
5.	Bibliografía	140
VII.	Conclusiones finales	143
1.	Conclusiones finales	144
2.	Final conclusions	146
VIII.	Anexo 1	149
1.	Índice de tablas	150
2.	Índice de Figuras	150
IX.	Anexo II: Publicaciones a las que ha dado lugar esta tesis	153

I. Capítulo I: Introducción

1.	Presentación y objetivos	3
2.	Introducción	5
2.1.	Fluidos supercríticos	5
2.1.1.	Generalidades sobre los fluidos supercríticos	5
2.1.2.	Fluidos supercríticos para la industria alimentaria	7
2.2.	Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	8
2.2.1.	Legislación	8
2.2.2.	Equipamiento básico para la extracción supercrítica	10
2.2.3.	Aplicaciones a escala industrial	10
2.2.4.	Aplicaciones a escala de laboratorio	11
2.3.	Otras aplicaciones de los fluidos supercríticos	12
2.4.	Ingredientes alimentarios con propiedades funcionales	14
2.4.1.	Antioxidantes	15
2.4.1.1.	Medida de la actividad antioxidante	17
2.4.2.	Antimicrobianos	18
2.4.3.	Reglamento CE sobre nuevos alimentos	19
2.5.	Microalgas	20
2.5.1.	Spirulina platensis	20
2.5.2.	Dunaliella salina	24
2.5.3.	Chaetoceros muelleri	26
2.5.4.	Antecedentes de extractos de microalgas	28
2.5.5.	SFE y microalgas	29
2.5.5.1.	Aplicaciones industriales y patentes	30
2.5.5.2.	Páginas web de interés	31
3.	Bibliografía	32

1. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

El interés por los alimentos funcionales es cada vez mayor, dado que éstos, además de satisfacer las necesidades energéticas y nutricionales básicos, son capaces de aportar beneficios adicionales a nuestra salud. Además, existe una tendencia entre los consumidores dirigida hacia la ingesta de productos procedentes de fuentes naturales en contraposición a los obtenidos de forma sintética. Por este motivo, parte de la I+D+i en Ciencia y Tecnología de los Alimentos se dirige a la obtención de ingredientes alimentarios funcionales procedentes de fuentes naturales. Concretamente ésta es una de las líneas de investigación fundamentales del grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, formado por investigadores del grupo de Ciencias de la Alimentación de la UAM junto con investigadores del IFI-CSIC. Sin embargo, una de las particularidades de este grupo es la forma de abordar la obtención de ingredientes alimentarios funcionales, a través del empleo de tecnologías medioambientalmente limpias, como la extracción con fluidos supercríticos (SFE). Es en esta línea de investigación donde se enmarca el proyecto de investigación bajo el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral: “Extracción con fluidos sub- y supercríticos de compuestos de interés alimentario procedentes de microalgas. Caracterización y estudio de sus propiedades funcionales *in-vitro* e *in-vivo*”. Los principales objetivos del mismo consistían en contribuir al desarrollo de tecnologías limpias de extracción para la producción de nuevos ingredientes alimentarios con propiedades funcionales a partir de fuentes naturales (microalgas), así como en el desarrollo de metodologías analíticas capaces de permitir la caracterización de los extractos obtenidos.

El presente trabajo se centra en el empleo de procesos de extracción con CO₂ en condiciones sub- y supercríticas. La memoria está dividida en siete capítulos. En el primero, a modo de introducción, se tratan tanto la técnica empleada en la obtención de los extractos, como el interés y las regulaciones referentes a los alimentos funcionales; por último, se aborda el empleo de las microalgas como fuente de ingredientes funcionales.

En el segundo capítulo se describe la optimización de la extracción mediante SFE de *Spirulina platensis* con el doble objetivo de maximizar el rendimiento global de extracción así como modelar de matemáticamente el comportamiento de la extracción de vitamina E a partir de esta microalga.

En el tercer capítulo se profundiza en la caracterización química y funcional de los extractos SFE de Spirulina. La caracterización funcional se refiere a la medida de las actividades antioxidante y antimicrobiana de los extractos, mientras que la caracterización química de los extractos se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas. El objetivo final es el de establecer una relación entre la composición química y la actividad funcional.

En el cuarto capítulo se aborda el estudio de la extracción con CO₂ sub- y supercrítico de *Dunaliella salina*, mediante un diseño experimental, así como el análisis de los diferentes carotenoides obtenidos. Además, se realiza un modelado matemático para correlacionar la presencia de los diferentes isómeros de β -caroteno con la actividad antioxidante observada.

En el quinto capítulo se muestra el estudio de la capacidad antimicrobiana de los extractos de *Dunaliella salina*, así como el análisis mediante cromatografía de gases (GC) de los principales compuestos con actividad antimicrobiana presentes en los extractos, concretamente en su fracción volátil y en su perfil de ácidos grasos.

El sexto capítulo está dedicado al estudio de la correlación entre la actividad antimicrobiana y la composición de los extractos supercríticos de la diatomea *Chaetoceros muelleri*. Debido a su conocida presencia en diferentes lípidos se realizó una caracterización en profundidad de su fracción lipídica empleando además de la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos con detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD).

Por último en el séptimo capítulo se exponen las conclusiones finales de los diferentes estudios presentados a lo largo de esta memoria. Asimismo, en el anexo se presentan las principales publicaciones a las que esta tesis ha dado lugar

Por tanto, el objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido la obtención y caracterización química y funcional de ingredientes alimentarios con propiedades bioactivas a partir de microalgas, utilizando la extracción con fluidos supercríticos como tecnología medioambientalmente limpia de producción.

Para poder llevar a cabo dicho objetivo principal se consideraron los dos objetivos parciales siguientes:

- ✖ Desarrollo de nuevos métodos de extracción mediante SFE para la obtención de extractos con actividades funcionales y estudio de los factores que influyen en el proceso de extracción.
- ✖ Desarrollo y aplicación de técnicas y métodos de análisis para la separación e identificación de los compuestos responsables de las actividades funcionales observadas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Fluidos supercríticos

2.1.1. Generalidades sobre los fluidos supercríticos

Los estados de agregación de la materia que se conocen actualmente son cinco: sólido, líquido, gas, plasma y condensado de Bose-Einstein. Un fluido supercrítico es un cuasi-estado con propiedades intermedias entre líquidos y gases, como se puede apreciar en la Tabla I-1.

Tabla I-1.- Densidad, viscosidad y difusividad de diferentes fluidos tipo

	Densidad (g/ml)	Viscosidad (g/cm×s)	Difusividad (cm ² /s)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
Líquido	1	10 ⁻²	10 ⁻⁶
Fluido supercrítico	0,2-0,9	10 ⁻⁴	10 ⁻³

En un diagrama de fases clásico como el de la Fig. I-1, las curvas de fusión, sublimación y vaporización muestran las zonas de coexistencia de dos fases. Tan solo hay un punto de coexistencia de tres estados, el llamado punto triple (PT). El cambio de estado se asocia a un cambio brusco de densidad y, para que se produzca, es necesario un aporte extra de energía denominado entalpía de cambio de estado. Pero por encima del punto crítico (PC) este cambio de densidad no se produce, por tanto, podríamos definir este punto como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar; y por ende un fluido supercrítico es aquel que se encuentra por encima de dicho punto (¹Luque de Castro, Valcarcel *y col.*, 1993).

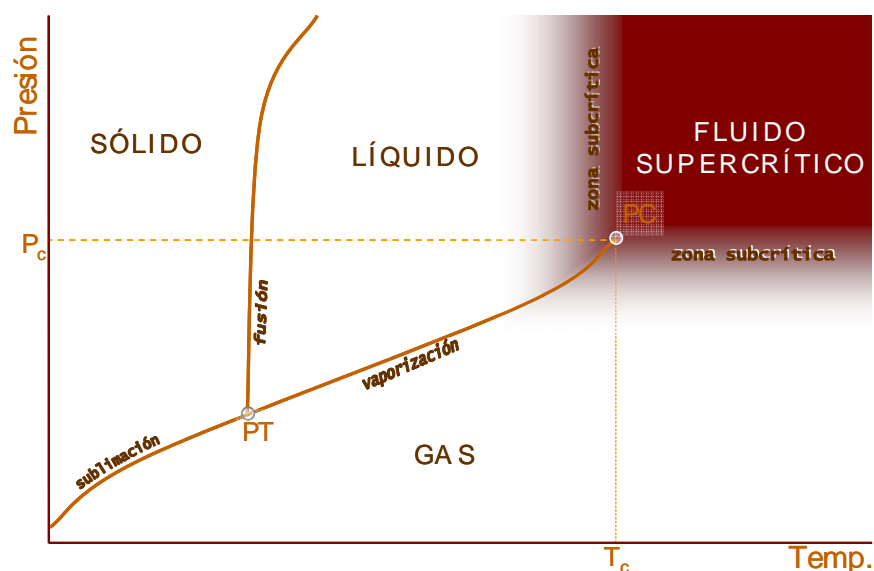


Fig. I-1.- Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT: punto triple, PC: punto crítico, Pc: presión crítica, Tc: temperatura crítica

El punto crítico fue definido por primera vez en 1822 por el Barón Charles Cagniard de la Tour al observar que si un gas se calienta por encima de cierta temperatura (T_c), por más que se comprima éste no alcanza el estado líquido.

Tanto el punto triple como el punto crítico son característicos de cada sustancia. En la Tabla I-2 se pueden ver las condiciones de presión y temperatura que definen el punto crítico de las sustancias más estudiadas.

Tabla I-2.- Propiedades críticas de las sustancias más comúnmente empleadas en condiciones supercríticas

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Presión crítica (bar)	Temperatura crítica (°C)	Densidad crítica (g/ml)
Dióxido de carbono	44,01	72,0	31,1	0,47
Agua	18,02	214,8	374,2	0,32
Amoniaco	17,03	109,8	132,5	0,23
Argón	39,95	48,6	-122,4	0,73
Acetona	58,08	47,0	235,0	0,28
Etanol	46,07	72,0	243,4	0,28
Metanol	32,04	78,9	239,0	0,27
Metano	16,04	46,0	-82,6	0,17
Etano	30,07	47,6	32,3	0,20
n-Propano	44,10	42,4	96,7	0,22
n-Butano	58,12	70,6	152,0	0,23
n-Pentano	72,15	32,9	196,0	0,23
n-Hexano	86,16	30,1	234,2	0,23
Dimetiléter	46,07	52,6	126,2	0,26
Dietiléter	74,12	63,8	193,6	0,27
Piridina	79,10	56,3	347,0	0,31

El punto crítico posee diversas propiedades muy peculiares:

- ✗ No existe interfase gas-líquido
- ✗ La compresibilidad isotérmica se hace infinitamente positiva
- ✗ El coeficiente de expansión térmica es infinito y positivo
- ✗ La entalpía de vaporización es cero
- ✗ Si la densidad se mantiene constante, e igual a la densidad crítica, la capacidad calorífica a volumen constante tiende al infinito

Al igual que ocurre con el punto crítico, la región supercrítica también tiene unas propiedades que la hacen peculiar:

- ✗ La densidad por encima del punto crítico depende de la presión y la temperatura, pero en cualquier caso está más cercana a la de los líquidos que a la de los gases. La densidad aumenta si lo hace la presión a temperatura constante o si disminuye la temperatura a presión constante, tal y como se muestra en Fig. I-2.
- ✗ La viscosidad es mucho más baja que la de los líquidos, lo que le confiere propiedades hidrodinámicas muy favorables.
- ✗ La bajísima tensión superficial permite una alta penetrabilidad a través de sólidos porosos y lechos empaquetados.

- ✖ Los coeficientes de difusión (difusividad) son mucho mayores que en líquidos, por lo que la transferencia de materia es más favorable.

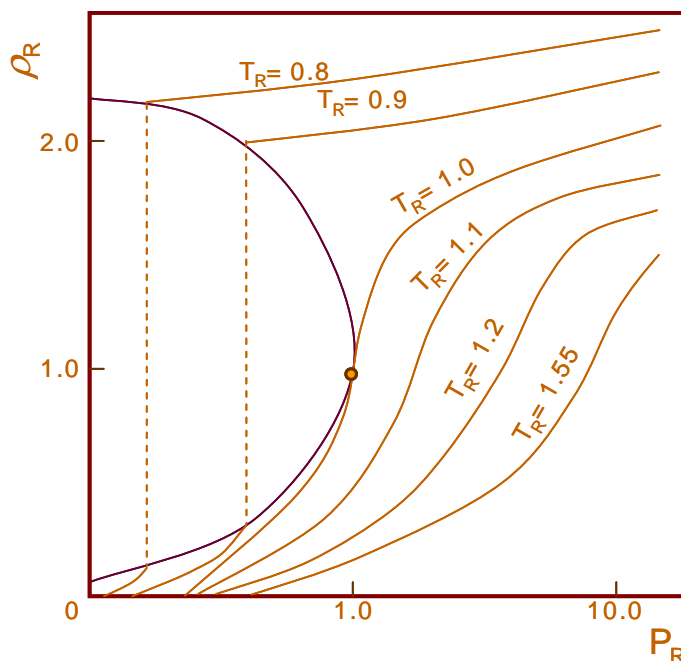


Fig. I-2.- Variación de la densidad en función de la presión y temperatura en las cercanías del punto crítico. P_R , T_R y ρ_R son las variables reducidas ($P_R = P/P_C$, $T_R = T/T_C$ y $\rho_R = \rho/\rho_C$).

2.1.2. Fluidos supercríticos para la industria alimentaria

Un fluido debe poseer una serie de propiedades, además de las anteriormente mencionadas, para poder emplearse como disolvente en la industria y, especialmente, en la industria alimentaria. Éstas son:

- ✖ Alta capacidad disolvente además de selectiva
- ✖ Nula o baja inflamabilidad
- ✖ Fácil de obtener en elevada pureza
- ✖ Bajo precio
- ✖ Baja o nula toxicidad
- ✖ No ser agresivo con el medio ambiente
- ✖ No ser corrosivo
- ✖ Poseer condiciones críticas moderadas
- ✖ Gaseoso en condiciones de presión y temperatura ambiente

De entre los fluidos supercríticos más estudiados (Tabla I-2), el que mejor cumple con todas estas propiedades es el CO_2 , con la salvedad de su apolaridad que, en principio, limita su poder solvente para sustancias polares (Tabla I-3).

Como todas las sustancias, el CO_2 es susceptible de ser polarizado al variar la densidad, es decir, al variar su presión y su temperatura, pero la polarizabilidad del CO_2 es mucho menor que la de los hidrocarburos. En este sentido, para conseguir una polarizabilidad por unidad de volumen

comparable a la del ciclohexano líquido se necesita una presión de 2700 bar y 45 °C (King & Bott, 1993). Existe una alternativa al uso de condiciones tan extremas que consiste en la adición de pequeñas cantidades ($\leq 10\%$) de modificadores, es decir, sustancias polares como etanol o agua, que añadidas al CO₂ varían enormemente la polaridad del fluido extractante. En ocasiones los modificadores no sólo sirven para aumentar la polaridad del CO₂ sino que se emplean con el objetivo de mejorar su capacidad solvente, por lo que también se emplean sustancias apolares.

Tabla I-3.- Solubilidad de ingredientes botánicos en CO₂ supercrítico (Moyler, 1993)

Muy solubles	Moderadamente solubles	Prácticamente insolubles
Compuestos apolares o poco polares de bajo peso molecular (<250 g/mol), mono y sesquiterpenos, ácido acético, benzaldehído, hexanol, glicerol o acetatos	Compuestos de medio-alto peso molecular (<400 g/mol), terpenos, sesquiterpenos sustituidos, agua, ácido oleico, lípidos saturados de longitud de cadena superior a C12	Compuestos de pesos moleculares superiores a 400 g/mol, azúcares, proteínas, taninos, ceras, sales inorgánicas, clorofilas, plaguicidas...

Al tratar el presente trabajo de la obtención de ingredientes alimentarios, sólo se deberían emplear como modificadores compuestos declarados GRAS (Generally Recognized As Safe^b) por las autoridades competentes en materia alimentaria como son la FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), la FAO (Food and Agriculture Organization, Naciones Unidas) o la EFSA (European Food Safety Authority, Unión Europea), es decir, etanol y agua. Estos junto con el CO₂, son precisamente los seleccionados para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

2.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

2.2.1. Legislación

En un proceso de extracción industrial, uno o más componentes se separan de la mezcla introducida, pudiendo ser el producto deseado tanto el extracto como el residuo de extracción. Actualmente la legislación española en materia de *disolventes de extracción empleados en el ámbito alimentario* es competencia ejecutiva de la Comisión Europea (Libro blanco sobre Seguridad Alimentaria, COM (1999) 719, de 12 enero) quien decidió una aproximación de las legislaciones de los estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes en junio de 1988, por medio de la Directiva 88/344/CEE. Dicha directiva se encuentra transpuesta al ordenamiento jurídico español por medio del Real Decreto 472/1990, de 6 abril por el que se regulan los disolventes de extracción utilizados en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes (B.O.E. 12.04.1990). Tras la última modificación efectuada (RD 2667/1998), la lista de disolventes que pueden emplearse, respetando siempre las “buenas prácticas de fabricación” (GMP), tanto para extracción como para la redisolución de extractos, es la siguiente:

- Agua
- Propano.

^b <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html> (Numerical Listing of GRAS Notices)

- c. Butano.
- d. Acetato de butilo.
- e. Acetato de etilo.
- f. Etanol.
- g. Anhídrido carbónico.
- h. Acetona
- i. Protóxido de nitrógeno.

Además de los disolventes incluidos en dicha lista, se podrán emplear otros siempre que se utilicen según las indicaciones que aparecen en el anexo del RD 472/1990. Quedan excluidos del uso todos aquellos disolventes que no estén incluidos expresamente en el mismo.

Esta legislación define un disolvente de extracción como (art. 2.2 RD 472/1990) “un disolvente utilizado en el proceso de extracción durante el tratamiento de materias primas, de productos alimenticios, de componentes o de ingredientes de dichos productos, que se elimine y que pueda provocar la presencia, involuntaria pero técnicamente inevitable, de residuos o de derivados en el producto alimenticio o en el ingrediente (...) Se considera que un disolvente de extracción se utiliza de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación si su empleo solo produce la aparición de residuos o de derivados y en cantidades técnicamente inevitables y que no suponen riesgos para la salud humana” (anexo parte I).

Y es precisamente en este punto donde reside otra de las ventajas del CO₂: que es un gas a temperatura y presión ambiente, con lo que la eliminación del disolvente de extracción es inmediata y la presencia de residuos prácticamente nula. Esto no ocurre en las extracciones “clásicas”, en las que se emplean disolventes orgánicos. Muchos de estos compuestos han demostrado ser tóxicos y perjudiciales tanto para la salud como para el medio ambiente.

Afortunadamente, en la actualidad existe una tendencia dirigida hacia la eliminación de este tipo de disolventes. Dos ejemplos claros de dicha tendencia son: el Protocolo de Montreal (1989) relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono y el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes, que entró en vigor en mayo de 2004 y que fue ratificado por España (BOE 23 junio 2004, núm. 151, [pág. 22737]; Instrumento de Ratificación del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, hecho en Estocolmo el 22 de mayo de 2001). Además, la decisión 2006/507/CE, firma, en nombre de la Comunidad Europea, el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. La UE ya ha adoptado instrumentos referentes a materias que rige el Convenio, incluidos el Reglamento (CE) nº 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a los contaminantes orgánicos persistentes.

Ambos tratados fueron propuestos por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y ratificados por una amplia mayoría de países entre ellos España y la Unión Europea. De hecho, el CO₂ no sólo está admitido en ambos tratados sino que está reconocido por las normas del Codex Alimentarius como apto para su empleo en alimentos ecológicos (Guidelines

for the production, processing, labelling and marketing of organically produced foods (GL 32 – 1999, Rev. 1 – 2001)).

2.2.2. Equipamiento básico para la extracción supercrítica

Los elementos mínimos que debe incluir un equipo de extracción supercrítica se pueden ver en el esquema de la Fig. I-3. El CO₂ procedente de la botella (A) es impulsado por la bomba (B), hasta que en la celda de extracción (C), donde se encuentra la materia prima a extraer, se alcanza la presión de trabajo, esta presión es controlada por la válvula (D). La celda de extracción se encuentra termostatzada para poder operar en condiciones de temperatura controlada (superior a la TC). Los componentes de la materia prima disueltos o arrastrados por el CO₂ precipitan en el separador (E) debido a la disminución del poder solvente del CO₂ al reducir la presión. En caso de que sea necesaria la adición de modificadores (F), éstos suelen mezclarse con la corriente de CO₂ a “baja presión” antes de la bomba de CO₂ (G).

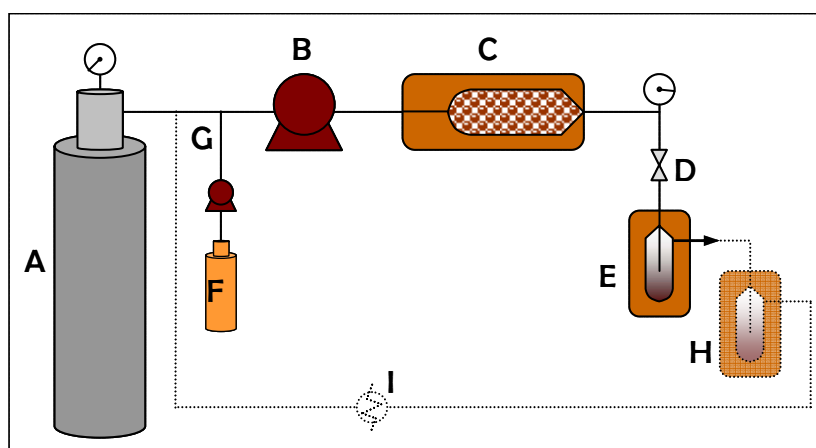


Fig. I-3.- Esquema básico de un extractor de fluidos supercríticos

Dado que los alimentos suelen ser mezclas altamente complejas, lo más habitual es que los extractos obtenidos también lo sean. Por ello es muy frecuente tener que realizar un fraccionamiento de extractos. El fraccionamiento en condiciones supercríticas consiste en una caída en cascada de la densidad (disminución progresiva del poder disolvente) con la consiguiente precipitación en cascada de los compuestos extraídos en los separadores donde se produce esta disminución de densidad. Para poder realizar fraccionamiento supercrítico sería necesario añadir un segundo separador (H) al equipo básico de la Fig. I-3. Además, si se quiere hacer una recirculación de CO₂, lo único necesario sería licuar el CO₂ a la salida de los separadores mediante una etapa de enfriado con un intercambiador de calor (I).

2.2.3. Aplicaciones a escala industrial

La SFE es una técnica que desde hace varias décadas encontró su nicho entre los procesos industriales de extracción, especialmente en la industria alimentaria, tal y como se muestra en la Fig. I-4. Las primeras patentes de descafeinación de café datan de 1974 (⁴Roselius, Vitzthum y col., 1974;

⁵Zosel, 1974) y desde entonces se han patentado más de ciento ochenta procesos para la extracción con fluidos supercríticos de alcaloides de diversas fuentes. Aún así, es en el área de los fitoquímicos donde las aplicaciones industriales de los fluidos supercríticos tienen un mayor campo de actuación. Hoy en día, las principales aplicaciones industriales de la SFE en la industria alimentaria se podrían resumir en las siguientes: descafeinación de café y te, extracción de aceite esencial de especias, obtención de extracto de lúpulo, concentrado de aromas y fragancias vegetales, extracción de pigmentos y antioxidantes de vegetales, extracción de plaguicidas naturales, y extracción y fraccionamiento de aceites y grasas (⁶Mukhopadhyay, 2000). Una de las aplicaciones industriales más populares de la SFE es obtención de extractos de lúpulo para la industria cervecera, de hecho ha sido objeto reciente de regulación mediante el Reglamento (CE) n° 1850/2006 de la Comisión, de 14 de diciembre de 2006, por el que se establecen disposiciones de aplicación para la certificación del lúpulo y productos del lúpulo.

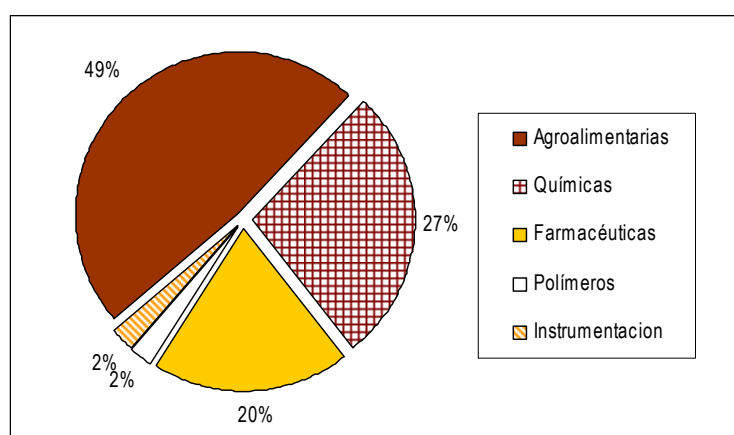


Fig. I-4.- Distribución de las patentes sobre extracción supercrítica en *Derwent Innovations Index* ^c en el periodo 1980-2007

2.2.4. Aplicaciones a escala de laboratorio

El empleo de SFE a escala de laboratorio se ha centrado fundamentalmente en aceites esenciales y oleorresinas de vegetales. Esto es debido a su posible utilización como ingredientes funcionales, principalmente como antioxidantes (⁷Herrero, Cifuentes *y col.*, 2006; ⁸Marr & Gamse, 2000; ⁹Wang & Weller, 2006). En general, los compuestos con actividad antioxidante suelen ser termolábiles o sufrir degradaciones si se emplean otras técnicas de extracción, algo que se puede evitar utilizando CO₂ supercrítico debido a su baja temperatura crítica y a que proporciona atmósferas de extracción no oxidantes.

En muchos casos, la SFE se ha empleado para la obtención de productos de alto valor añadido a partir de subproductos procedentes de la industria alimentaria como, por ejemplo, la obtención de licopeno y otros carotenoides a partir de residuos de tomate (¹⁰Baysal, Ersus *y col.*, 2000; ¹¹Vasapollo, Longo *y col.*, 2004). Los carotenoides son pigmentos termolábiles y fotodegradables cuyas propiedades antioxidantes están ampliamente documentadas (¹²Tapiero, Townsend *y col.*, 2004) y para los que la extracción con CO₂ supercrítico ha sido ampliamente utilizada (¹³Careri, Furlattini *y col.*,

^c <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=DIIDW&Func=Frame>

2001; ¹⁴Cserhàti & Forgacs, 2001; ¹⁵Mendes, Fernandes *y col.*, 1995). Otros subproductos estudiados como posible fuente de compuestos de alto valor añadido obtenidos mediante SFE, son, por ejemplo, la hoja de olivo (¹⁶de Lucas, Martínez de la Ossa *y col.*, 2002; ¹⁷Tabera, Guinda *y col.*, 2004) o los residuos vitivinícolas (¹⁸Chafer, Pascual-Martí *y col.*, 2005).

En muchas ocasiones se emplea la extracción con fluidos supercríticos como etapa de preparación de la muestra previa al análisis instrumental. En general, la utilización de SFE en lugar de extracciones tipo Soxhlet suele estar justificada por la reducción de los tiempos de extracción, así como por la selectividad que se puede llegar a obtener. En este sentido, se emplea la SFE, por un lado, para la eliminación de posibles compuestos que puedan interferir en el análisis, por ejemplo eliminación de grasa para el análisis de la fracción hidrosoluble (¹⁹Lang, Wai *y col.*, 2004), pero habitualmente se utiliza como método de concentración del analito buscado. En este sentido se han realizado diversas revisiones en los últimos años (²⁰Lehotay, 1997; ²¹Mendiola, Herrero *y col.*, 2007; ²²Rodríguez-Bernaldo de Quiros & Costa, 2006; ²³Turner, King *y col.*, 2001; ²⁴Wang & Muttucumaru, 2002).

Además de emplearse en el análisis de muestras alimentarias, es importante destacar la utilización de la extracción con CO₂ supercrítico en muestras medioambientales o sanitarias dada la hidrofobicidad que presentan muchos de los contaminantes y toxinas, como pueden ser: plaguicidas (²⁵Goncalves, Carvalho *y col.*, 2006; ²⁶Kreuzig, Koinecke *y col.*, 2000; ²⁷Nerin, Batlle *y col.*, 2002), hidrocarburos aromáticos policíclicos (²⁸Buszewski, Buszewska *y col.*, 2003; ²⁹Fuoco, Giannarelli *y col.*, 2005; ³⁰Librando, Tomaselli *y col.*, 2005; ³¹Wong & Wang, 2001), residuos de tabaco (³²Prokopczyk, Hoffmann *y col.*, 2002) o diversos fármacos (³³Arancibia, Valderrama *y col.*, 2003).

2.3. Otras aplicaciones de los fluidos supercríticos

La principal aplicación de los fluidos supercríticos es la extracción supercrítica (SFE) pero, además de ésta, el empleo de diversos fluidos en condiciones sub y supercríticas está muy extendido a diversos ámbitos tanto industriales como experimentales.

En el ámbito de la purificación, la técnica que más interés ha despertado es la cromatografía supercrítica (SFC, Supercritical Fluid Chromatography). Como ya se ha comentado, los fluidos supercríticos combinan las propiedades de los líquidos (densidad, poder solvente) y de los gases (difusividad, ausencia de tensión superficial), por tanto, la cromatografía de fluidos supercríticos podría situarse a medio camino entre la cromatografía de gases y la de líquidos. Además, presenta la ventaja de la disolución selectiva de los analitos al variar las condiciones de presión y/o temperatura del fluido empleado, comúnmente CO₂. En general, se suelen obtener separaciones más rápidas que las obtenidas en HPLC debido a los elevados coeficientes de difusión de los solutos en el fluido supercrítico. Es en el campo de las separaciones farmacéuticas donde la SFC ha alcanzado mayor desarrollo, debido a su empleo no sólo a escala analítica sino también a escala preparativa. En los últimos años se han realizado diversas revisiones sobre muy diversas aplicaciones de la SFC: sobre el análisis de vitaminas liposolubles (²³Turner, King *y col.*, 2001), de ácidos grasos (³⁴Senorans & Ibanez,

2002), o bien sobre sus aplicaciones en ciencia forense (³⁵McAvoy, Backstrom *y col.*, 1999) e incluso sobre su empleo en la determinación de propiedades termodinámicas (³⁶Roth, 2004).

A principio de los noventa se empezó a desarrollar la extrusión con fluidos supercríticos con el fin de obtener nuevos productos alimentarios o alimentos funcionales. Esta modalidad de extrusión permite el uso de ingredientes termolábiles, como son las proteínas del suero, vitaminas, compuestos aromáticos y nutraceuticos, entre otros (³⁷Berry, 2000; ³⁸Rizvi, Mulvaney *y col.*, 1995).

Asimismo, los fluidos supercríticos se han empleado como medio de reacción para la obtención y catálisis de los más diversos productos, principalmente en campos como la síntesis orgánica debido, entre otras propiedades, a la diastereoselectividad inducida por los cambios de presión (³⁹Jessop & Leitner, 1999). Pero no menos importante es la catálisis enzimática desarrollada en medio supercrítico, ya que las tasas de transferencia de materia son mayores que con disolventes líquidos y, además, se pueden integrar los procesos de catálisis y fraccionamiento. En los últimos años se han publicado diversas revisiones sobre la catálisis enzimática en medio supercrítico (⁴⁰Knez & Habulin, 2002; ⁴¹Krishna, 2002; ⁴²Matsuda, Harada *y col.*, 2004; ⁴³Turner, King *y col.*, 2004). Una técnica que combina las reacciones y extracciones en medio supercrítico es la denominada inmunoextracción supercrítica (⁴⁴Bauza, Ríos *y col.*, 2004) consistente en la formación de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo en medio supercrítico y su posterior purificación vía SFE.

Desde que a principios de los noventa se desarrolló la preparación de aerogeles, la influencia de los fluidos supercríticos ha sido es cada vez mayor (⁴⁵Fricke & Tillotson, 1997). Los fluidos supercríticos se emplean en el paso de secado del gel permitiendo, gracias a su ausencia de tensión superficial, mantener la estructura del mismo (⁴⁶Moreno-Castilla & Maldonado-Hodar, 2005). La posibilidad de mantener la estructura interna del gel permite el empleo de toda la superficie del mismo para su uso posterior, entre otros, en procesos de catálisis incluyendo en la estructura del gel un catalizador orgánico, inorgánico o incluso enzimático (⁴⁷Fabrizioli, Burgi *y col.*, 2002; ⁴⁸Maurry, Buisson *y col.*, 2004; ⁴⁹Pierre & Buisson, 2001).

Un proceso que despierta un gran interés en la actualidad es la cristalización supercrítica, fundamentalmente en la industria farmacéutica y dirigida a la obtención de partículas apropiadas para una administración por vía inhalatoria o parenteral. Existen diversas metodologías para llevar a cabo la precipitación supercrítica (⁵⁰Pasquali, Bettini *y col.*, 2006); algunos de ellos se comentan a continuación:

- ✱ RESS (rapid expansion of a supercritical solution): los solutos disueltos en el fluido supercrítico son sometidos a una rápida expansión o descompresión asociada a un calentamiento súbito que conlleva su precipitación. En este caso, el tamaño y forma de las partículas depende tanto de las condiciones de expansión como de la concentración inicial de solutos. Un ejemplo es la obtención de analgésicos (⁵¹Hirunsit, Huang *y col.*, 2005; ⁵²Ranjit & Ram, 2006; ⁵³Thakur & Gupta, 2006) o bien en la micronización de manteca de cacao (⁵⁴Letourneau, Vigneau *y col.*, 2005).
- ✱ SAS (solvent-antisolvent): los solutos que se pretenden cristalizar se disuelven en un disolvente que a su vez es soluble en CO₂; en este caso la precipitación se consigue por la

súbita disminución de la solubilidad en el disolvente al añadir un segundo disolvente (CO₂) incompatible con el soluto, denominado antisolvente. El tamaño y forma de la nucleación es función de la difusión del antisolvente (fluido supercrítico) en la fase orgánica y la velocidad de “evaporación” de fase orgánica. Esta técnica está especialmente indicada para la obtención de micro o nanocristales de proteínas, péptidos o incluso fragmentos de ADN (⁵⁵Ozge Guney, 2002).

- ✖ Atomización supercrítica: esta técnica combina las dos anteriores con la atomización clásica, permitiendo la cristalización de productos termolábiles y sin necesidad de emplear recipientes de alta presión (⁵⁶Reverchon & Antonacci, 2007).
- ✖ Encapsulación supercrítica: este proceso puede ser similar a la atomización supercrítica o bien a SAS pero además de la solución con el soluto se incluye una segunda solución con un polímero. Cuando el CO₂ extraiga el disolvente, el soluto cristalizará junto con el polímero de forma que quedará encapsulado. De este modo se han obtenido tanto nuevos sistemas de administración de fármacos como catalizadores inmovilizados (⁵⁷Wang, Pfeffer y col., 2004; ⁵⁸Wang, Wang y col., 2006; ⁵⁹Yue, Yang y col., 2004).
- ✖ Fraccionamiento supercrítico por antisolvente: es una técnica que combina tanto la precipitación (principalmente SAS) con la extracción supercrítica. La solución de alimentación en este caso suele ser una mezcla compleja, como por ejemplo un extracto acuoso de plantas. Los compuestos que no son solubles en CO₂ precipitan en un primer recipiente junto con el agua, el resto se somete a un fraccionamiento en cascada (⁶⁰Catchpole, Grey y col., 2004; ⁶¹Mende & Catchpole, 2005).

2.4. Ingredientes alimentarios con propiedades funcionales

Como se ha comentado anteriormente, el principal objetivo del proyecto en el cual se enmarca el presente trabajo es el desarrollo de ingredientes alimentarios con propiedades funcionales, esto es, un ingrediente que además de aportar sabor, aroma o color sea beneficioso para alguna función del organismo (⁶²Goldberg, 1996). En nuestro caso las funcionalidades estudiadas han sido la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos.

A pesar de que el término *Alimento Funcional* se encuentra bastante extendido, no ha sido definido en profundidad por los principales organismos y agencias nacionales e internacionales (⁶³Katan & Roos, 2004). Por el momento, la Unión Europea no reconoce los alimentos funcionales como una categoría específica de alimentos (⁶⁴Coppens, Fernandes da Silva y col., 2006), de modo que tan solo algunos de los alimentos considerados actualmente funcionales podrían incluirse dentro de la normativa europea aplicable a los denominados alimentos dietéticos (Comisión Europea, Propuesta de Reglamento COM (2003) 424, de 16 julio sobre las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos y Directiva 2001/15/CE, de 15 febrero sobre sustancias que

pueden añadirse para fines de nutrición específicos en alimentos destinados a una alimentación especial). Incluso en Japón, país donde este término se acuñó en primer lugar, no se ha propuesto una definición más concreta. En dicho país, se comenzó a emplear en la década de los ochenta el término FOSHU (acrónimo en inglés de Food Of Specific Health Use) refiriéndose a alimentos procesados que contenían ingredientes que podrían tener un efecto fisiológico beneficioso.

Es importante destacar ciertos aspectos a la hora de diseñar un alimento funcional:

- ✗ el efecto funcional es distinto del nutritivo;
- ✗ debe demostrar satisfactoriamente dicha actividad funcional;
- ✗ esta actividad puede consistir en una mejora de las funciones fisiológicas o en una reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad.

Esta definición, si bien es amplia, debe ir acompañada de ciertas premisas, entre las cuales destacan: i) el alimento funcional debe ejercer su función beneficiosa en el organismo cuando se ingiere en cantidades normales de consumo, y ii) debe mantener tanto la estructura como la forma de su alimento análogo no-funcional.

Desde diciembre de 2006 la Unión Europea cuenta con un reglamento regulador de las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los productos alimenticios (Reglamento CE 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos^d), norma que afecta a la comunicación publicitaria y etiquetado de los mismos. La gran aportación de este reglamento consiste en la obligación de que toda alegación presente en el etiquetado deberá estar provista de la evidencia científica que la justifique. Además, otra novedad de dicho reglamento consiste en la inclusión del “perfil nutricional” como criterio para “regular las circunstancias en que puedan hacerse las declaraciones. Deben basarse en pruebas científicas generalmente aceptadas en lo que se refiere a la relación entre la dieta y la salud. Sin embargo, los perfiles también deben permitir la innovación de los productos, y deben tener en cuenta la variabilidad de los hábitos y tradiciones dietéticos, así como que determinados productos concretos pueden desempeñar un papel importante en el contexto de una dieta global”^e.

En España las competencias de cesación o rectificación de la publicidad referente a las alegaciones nutricionales son competencia de la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición; Ley 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios, B.O.E. 30 de diciembre de 2006).

2.4.1. *Antioxidantes*

Como es bien conocido, los lípidos son constituyentes mayoritarios de los sistemas biológicos entre los cuales se incluyen, obviamente, la inmensa mayoría de los alimentos. La autooxidación de

^d Modificado en lo relativo a su relación con las legislaciones de los estados por Reglamento (CE) nº 107/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y por el Reglamento (CE) nº 109/2008

^e El establecimiento de perfiles nutricionales por parte de la Unión Europea ha de estar terminado antes del 19 de enero de 2009 (Art. 4)

los lípidos ocurre naturalmente en dichos sistemas biológicos cuya protección propia contra dicho fenómeno no siempre es suficiente. En el caso de los alimentos, los procesos de transformación y almacenamiento producen pérdidas de antioxidantes endógenos, por lo que frecuentemente es necesaria la adición de antioxidantes exógenos. El empleo de antioxidantes en Tecnología de los Alimentos está muy extendido. Comenzaron a usarse como aditivos en los años 40 y hoy en día se aplican a multitud de productos (⁶⁵Madhavi, Despande *y col.*, 1996). La legislación española que regula el uso de antioxidantes, así como de otros aditivos distintos de colorantes y edulcorantes es el Real Decreto 142/2002, de 1 febrero que aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. (BOE 20 febrero 2002, núm. 44, [pág. 6756]).

En los últimos años ha aumentado extraordinariamente el interés general por los antioxidantes de uso alimentario ya que también parecen desempeñar un importante papel en relación con la salud (⁶⁶Urala & Lahteenmaki, 2007). Por un lado, sirven para evitar la generación de los productos de la oxidación lipídica en los alimentos que pueden tener serios efectos tóxicos para los consumidores. Por otro lado, se sabe que en los procesos metabólicos que tienen lugar en el cuerpo humano se producen continuamente, de forma natural, especies oxidantes que constituirían una seria amenaza para la salud, de no ser por las defensas naturales del cuerpo humano contra ellas. Estas defensas, que se basan fundamentalmente en sistemas enzimáticos (catalasas, peroxidasas...), minimizan los efectos tóxicos de los radicales libres pero van perdiendo efectividad con la edad (⁶⁷Langseth, 1995). Además de las fuentes endógenas de radicales, hay múltiples fuentes exógenas a las que la exposición es cada vez mayor, como son los contaminantes ambientales, la radiación solar, etc. Por tanto, las defensas naturales contra el denominado estrés oxidativo son cada vez más insuficientes. Aunque se necesita mucha más investigación al respecto, en la actualidad existen ya evidencias de la implicación de los radicales libres en el desarrollo de procesos tumorales, en la diabetes (⁶⁸Baynes, 1991), en la arteriosclerosis cardiovascular, en la formación de cataratas (⁶⁹Garewal, 1997), isquemia cerebral (⁷⁰Rodrigo, Fernandez *y col.*, 2005), infertilidad (⁷¹Alpay, Saed *y col.*, 2006), envejecimiento cerebral (⁷²Poon, Calabrese *y col.*, 2004) y un largo etcétera.

Recientemente se ha demostrado la acción sinérgica de algunos antioxidantes naturales con varias enzimas endógenas, como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, que potencian el efecto inhibitor de las mismas frente a los procesos degenerativos de las células (⁷³Cutler, 1991). Por tanto, se tiene el convencimiento de que es posible reforzar la protección natural del cuerpo contra los efectos del estrés oxidativo mediante un aumento de antioxidantes en la dieta (⁷⁴Heinonen, Meyer *y col.*, 1998; ⁷⁵Rahimi, Nikfar *y col.*, 2005). Es por ello por lo que interesa determinar cuáles son los antioxidantes individuales o, mejor aún, los complejos que combinan varios de ellos y las dosis adecuadas de los mismos, que proporcionan los beneficios óptimos para la salud. Como se muestra en la Tabla I-4 algunos de ellos ya han sido identificados.

El aumento de antioxidantes en la dieta puede consistir simplemente en modificaciones de la misma potenciando el consumo de frutas y vegetales, productos naturalmente ricos en vitamina C, vitamina E y carotenoides, que son los antioxidantes cuyos efectos están mejor estudiados. Sin embargo, es posible que los cambios en los hábitos dietéticos no sean suficientes y sea conveniente

reforzar los alimentos con suplementos de antioxidantes en determinadas situaciones fisiopatológicas, como por ejemplo en el caso de la diabetes y las complicaciones que ésta conlleva (⁷⁵Rahimi, Nikfar *y col.*, 2005). Como consecuencia, el consumo de alimentos y bebidas ricos en antioxidantes se generaliza entre las recomendaciones nutricionales (⁷⁷Packer, Hiramatsu *y col.*, 1999) y comienza a ser frecuente el diseño de alimentos con funcionalidad antioxidante (⁷⁸Hollingsworth, 1998).

Tabla I-4.- Ejemplos de antioxidantes dietéticos naturales cuya sinergia enzimática ha sido establecida (⁷⁶Scheibmeir, Christensen *y col.*, 2005)

Antioxidante de la dieta	Enzima
Vitamina C	Catalasa
Vitamina E	Co-Q ₁₀
Vitamina A y carotenoides	Peroxidasas
Ubiquinonas y ubiquinol	Superoxido dismutasa (SOD)

Por supuesto, es importante el control de la cantidad de antioxidante que se añade en el alimento, puesto que, como ya dijera Paracelso (Theophrastus Bombastus von Hohenheim) en el s. XVI “Todo es veneno y nada es veneno, sólo la dosis correcta diferencia entre un veneno y un remedio” (*dosis sola facit venenum*) y los antioxidantes no son una excepción. Existen en la literatura numerosas referencias sobre la toxicidad de los mismos (⁷⁹Bast & Haenen, 2002; ⁸⁰Fogliano & Vitaglione, 2005; ⁸¹Halliwell, 2000). Por ejemplo, la hipervitaminosis A ha sido relacionada con diversas situaciones patológicas ya en trabajos clásicos como el de Harris y Moore (⁸²Harris & Moore, 1929), mientras que excesos de vitamina E se han relacionado con problemas de coagulación (⁸³Kappus & Diplock, 1992) o tumores de piel (⁸⁴Mitchel & McCann, 1993). Los carotenoides tampoco se encuentran libres de controversia, principalmente por sus efectos pro-carcinógenos (⁷⁹Bast & Haenen, 2002; ⁸⁵Wang & Russell, 1999). Por tanto, parece obvio que la vía a seguir no es añadir antioxidantes bajo el lema “cuanto más, mejor” sino que es necesario determinar tanto la actividad antioxidante, como los efectos metabólicos de la adición del antioxidante (⁷⁹Bast & Haenen, 2002; ⁸¹Halliwell, 2000). Como ya se comentó, el presente trabajo se ha centrado en el primero de estos aspectos.

2.4.1.1. Medida de la actividad antioxidante

A pesar de encontrarse en la bibliografía multitud de métodos de medida de la actividad antioxidante, ninguno de ellos ha sido aprobado oficialmente para llevar a cabo esta determinación.

Habitualmente la determinación de la actividad antioxidante se lleva a cabo mediante el empleo de métodos *in vitro*. La utilización de este tipo de métodos está ampliamente reconocida (⁸⁶Le Totour, 1990; ⁸⁷Wessels, König *y col.*, 2000) para la realización de pruebas preliminares cuando bien existe un número elevado de muestras o bien no se tiene seguridad de que el compuesto a ensayar tenga la actividad buscada. Estos métodos son, en general, más sencillos, rápidos y menos costosos económicamente que los métodos *in vivo* y permiten saber si los compuestos ensayados tienen o no la

actividad buscada. Además, permiten obtener datos indicativos sobre la toxicidad celular de los distintos extractos, que pueden ser muy útiles a la hora del diseño de posteriores estudios.

En lo que respecta a los métodos *in vitro*, existen dos grandes grupos de métodos: directos e indirectos. Cuando se aplican métodos indirectos, lo más frecuente es la medición de la capacidad del antioxidante para la captación de radicales libres. Como ejemplo de estos métodos se encuentran el ABTS o el DPPH, ambos se comentarán más adelante. Por su parte, los métodos directos están asociados a la medición de productos de reacción de la cadena de peroxidación lipídica. Ejemplos de métodos directos son, entre otros, el método Rancimat[®] o el método de autooxidación del ácido linoleico. Roginsky y Lissi realizaron una extensa revisión de estos métodos en la que se exponían las ventajas y desventajas de cada uno de ellos (⁸⁸Roginsky & Lissi, 2005). No obstante, es importante remarcar la diferencia entre la medida de la actividad antioxidante en el alimento y su actuación posterior en sistemas biológicos, dado que las velocidades de oxidación lipídica dependen de cada individuo (⁸¹Halliwell, 2000).

2.4.2. *Antimicrobianos*

La necesidad de aumentar en la medida de lo posible la vida útil de los alimentos es un aspecto que ha acompañado a la humanidad desde el principio de los tiempos. Por ello se desarrollaron procedimientos de conservación mucho antes de que se comprendieran los principios implicados. Muchos de ellos proceden de fenómenos que ocurrían espontáneamente y que eran primeramente observados y luego explotados empíricamente. En la mayoría de las ocasiones, estos procesos están *diseñados* para reducir o evitar la proliferación de la carga microbiana. Lo más habitual es que dichos procesos incluyan etapas en las que el aporte de calor al alimento sea el protagonista por lo que es muy posible que se produzca desnaturalización de proteínas, ruptura de emulsiones, pérdida de humedad, destrucción de vitaminas, aceleración de reacciones químicas de deterioro, etc. Por ello, se ha planteado el uso de conservantes que no alteren las características del alimento, no obstante, muchos de estos productos resultan tóxicos a las dosis en que resultan eficaces para inhibir la proliferación microbiana. Por tanto, su uso está sujeto a restricciones legales al igual que el resto de los aditivos, como ya se mencionó en el apartado 2.4.1 (RD 142/2002). Concretamente, en España el proceso de evaluación del riesgo de los biocidas está regulado por el Real Decreto 1054/2002, de 11 octubre (BOE 15 octubre 2002, núm. 247, [pág. 36188] que Regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas).

Los extractos con actividad antimicrobiana no sólo han de conseguir alargar la vida útil del alimento, sino que, además, para que sean considerados alimentos funcionales han de producir algún beneficio adicional sobre la salud del consumidor. En el caso de los extractos con actividad antimicrobiana, este beneficio será su capacidad para sustituir a los antibióticos empleados como medicamentos. Desde que en 1977 se produjo el primer brote importante de pneumococos multirresistentes en Sudáfrica, el número de cepas de patógenos microbianos no ha dejado de crecer por motivos diversos. La emergente resistencia a los antibióticos ha sido denominada por Berkowitz como una catástrofe médica (⁸⁹Berkowitz, 1995). Por tanto, cada vez resulta más crítico desarrollar

nuevos compuestos con actividades antimicrobianas antes de que la humanidad entre en la era post-antibiótica. De hecho, cada vez son más los compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano que se obtienen de fuentes naturales como plantas, algas y hongos. Estos compuestos inactivan las cepas bacterianas por mecanismos diferentes a los antibióticos actuales lo que favorece su empleo como tratamiento alternativo o complementario (⁹⁰Eloff, 1998).

2.4.3. *Reglamento CE sobre nuevos alimentos*

Gracias a la ciencia y la tecnología, el mercado recibe con regularidad nuevos productos. Aun siendo tan variados como nuevos, todos tienen un denominador común: han de someterse a un procedimiento de evaluación y aprobación antes de ser comercializados. En 1997, la UE presentó el actual reglamento sobre Nuevos Alimentos y Nuevos Ingredientes Alimentarios (Reglamento CE 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre alimentos e ingredientes alimentarios nuevos), destinado a evaluar la seguridad de los productos alimentarios más recientes. El texto distingue cinco categorías de productos, en función de la tecnología aplicada o del origen de los alimentos y de sus ingredientes, que antes de 1997 no se habían destinado en Europa al consumo humano en cantidades significativas. Dada la diversidad y el alcance de los denominados “Nuevos Alimentos”, cada caso se estudia individualmente.

Para iniciar el procedimiento, las empresas que deseen comercializar un nuevo producto habrán de someterlo a las autoridades responsables de la seguridad alimentaria de su país. En cada Estado Miembro de la UE existe un organismo competente en la evaluación de los nuevos productos. Si lo considera oportuno, el Comité puede solicitar información más detallada sobre el producto a aprobar, o someterlo al Comité Toxicológico (COT), al Comité de Asuntos Médicos (COMA), o al Comité Consultivo sobre Liberación en el Medio Ambiente (ACRA). La norma hace especial hincapié en la evaluación del riesgo medioambiental, a los alimentos e ingredientes que contienen organismos genéticamente modificados (OMG).

Cuando un producto se somete a evaluación por primera vez en un país de la Unión Europea, éste envía la propuesta a los demás Estados Miembros para obtener su conformidad. En caso de no lograr el consenso, el asunto se traslada al Comité Científico para la Alimentación Humana (SCF), el organismo superior en materia de seguridad alimentaria designado por la Comisión Europea. Los expertos independientes que lo integran examinan los aspectos científicos y técnicos relativos a la salud y la seguridad alimentaria, y estudian en particular lo concerniente a la toxicidad e higiene de toda la cadena de producción.

El hecho de que la aprobación de todo nuevo producto alimenticio se someta a varios organismos de seguridad independientes pretende garantizar su calidad e inocuidad. Los interesados pueden consultar los sumarios de los debates sobre Nuevos Alimentos de estos comités en la página web de la Dirección General para la “Política de los Consumidores y Protección de la Salud de los Consumidores”, de la Comisión Europea: <http://europa.eu.int/comm/dg24>

En la lista de “novel foods” publicada en Febrero de 2008 se incluyen diversas microalgas o ingredientes producidos a partir de ellas, estos son:

- ✖ Suplementos con oleorresina enriquecida en Astaxantina de *Haematococcus pluvialis* de Cyanotech Corporation (Marzo 2007)
- ✖ Cápsulas con oleorresina enriquecida en Astaxantina de *Haematococcus pluvialis* (max 4 mg Astaxantina/capsula) de Herbal Sciences International Ltd.-US Nutra (Julio 2004)
- ✖ Aceite de microalgas enriquecido en DHA (docohexanoic-acid), DHActive™ de Nutrinova (Diciembre 2003)
- ✖ Microalga *Odontella aurita* de Innovalg S.A.R.L. Centre d’Algoculture (Diciembre 2002)

Además están en espera de aprobación los usos adicionales para el DHA procedente de la microalga *Ulkenia sp.* de Nutrinova

2.5. Microalgas

Dentro del grupo de algas y microalgas se clasifican aproximadamente unos cincuenta mil organismos diferentes cuya característica común es su fotoautotrofismo. Generalmente se clasifican dentro del reino vegetal, pero algunas, como por ejemplo *Spirulina*, han sido identificadas recientemente como bacterias (⁹¹Bergey, Garrity y col., 2001). Debido a su capacidad de realizar la fotosíntesis y a su adaptación a la vida en medios marinos o en aguas continentales, las algas en general han desarrollado compuestos de gran interés para la industria alimentaria y que pueden ser empleadas como fuente de ingredientes funcionales. Ejemplo de ello son: carotenoides y otros pigmentos fotoprotectores (antioxidantes) (⁶⁵Madhavi, Despande y col., 1996), ácidos grasos poliinsaturados (⁹²Robles Medina, Molina Grima y col., 1998), polisacaridos sulfatados (antivirales), esteroides (antimicrobianos), etcétera (⁹³Abalde, Cid y col., 1995; ⁹⁴Borowitzka, 1999; ⁹⁵Cohen, 1999).

En el presente trabajo se han estudiado tres especies de microalgas: *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* y *Chaetoceros muelleri*. El principal motivo para la elección de dichas microalgas ha sido la ausencia de toxinas. Además, las microalgas aquí empleadas son ampliamente utilizadas para la alimentación humana, directa (*Spirulina*) o indirectamente (*Dunaliella* y *Chaetoceros*). Se presentarán a continuación las principales características de cada una de ellas.

2.5.1. *Spirulina platensis*

Spirulina (o *Arthrospira*) pertenece al grupo *Cyanobacterium* (anteriormente conocido como *Cyanophyta*) o grupo de las algas verde-azuladas. Se trata de organismos unicelulares y fotoautótrofos. A pesar de ser unicelulares se agrupan formando tricomas o formas filamentosas (⁹⁶Van den Hoek, Mann y col., 1995).

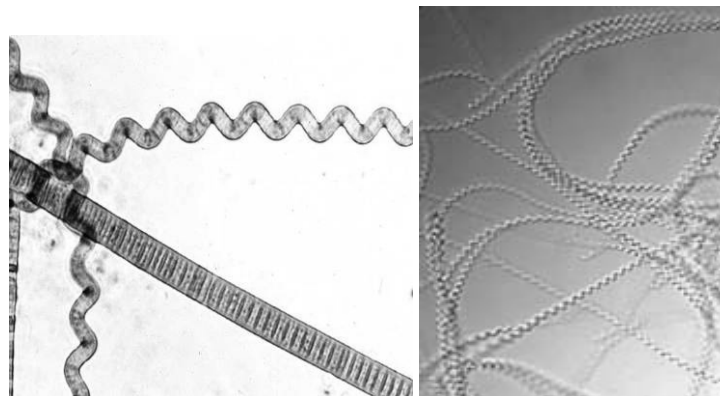


Fig. I-5.- Diferentes fotografías de *Spirulina platensis* vista al microscopio

Se trata de organismos con organización procariota pero presentan ciertos orgánulos típicos de eucariota. Poseen una región central, donde se localiza el ácido nucleico (una sola molécula de DNA), una región periférica que contiene las membranas tilacoidales y varias inclusiones o estructura citoplasmática, rodeada frecuentemente por una capa de mucílago. Dicha capa no está presente entre las células que forman el tricoma. La pared celular contiene peptidoglicano y la estructura y composición características de las bacterias Gram-negativas. En el citoplasma se encuentran las inclusiones (gránulos de polifosfato, glucógeno y cinanoficina), los carboxisomas o cuerpos poliédricos, donde está la RBP-carboxilasa (RuBisCo, la principal enzima responsable de la fijación fotosintética de CO_2) y ribosomas 70S (⁹⁷Jensen, 1993).

Las principales características de las microalgas del género *Cyanobacterium* son las siguientes:

- ✗ carecen de mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplasmático.
- ✗ en ningún momento de su ciclo vital existen formas flageladas.
- ✗ los pigmentos fotosintéticos están localizados en los tilacoides, que se mueven libremente por el citoplasma, en lugar de estar alojados en los cloroplastos como en los organismos eucariotas fotosintéticos. Estos tilacoides tan sólo poseen clorofila tipo a (Fig. I-6) pero no de los tipos b y c.

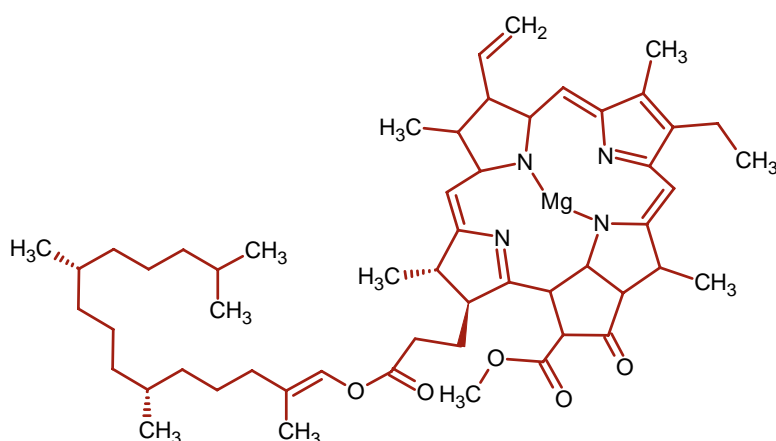


Fig. I-6.- Clorofila a, la única descrita hasta la fecha en microalgas del género *Cyanobacterium*.

- ✗ el polisacárido de reserva es almidón cianofíceo (α -1,4), que es muy similar al glucógeno de los animales y a la fracción de amilopectina de las plantas superiores.

- ✗ contienen gránulos de cianoficina que consisten en pequeños polímeros de arginina-asparagina.
- ✗ muchas veces el color verde debido a la clorofila se encuentra enmascarado por otros pigmentos como ficocianina (cuyo núcleo tetrapirrólico puede verse en la Fig. I-7), aloficocianina (azules ambos) o bien ficoeritrina (roja). Estos pigmentos se almacenan en corpúsculos denominados ficobilisomas que se sitúan sobre la superficie externa de los tilacoides. Su estructura común es la de un núcleo tetrapirrólico abierto unido por un puente de azufre a la proteína. Las proteínas se agrupan formando trímeros que son los que forman los ficobilisomas.

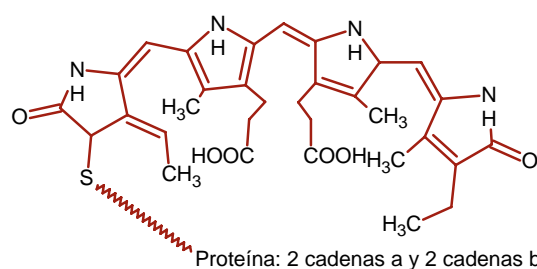


Fig. I-7.- Núcleo tetrapirrólico extendido de la ficocianina.

- ✗ su reproducción es únicamente asexual, la recombinación genética se produce por medios parasexuales como en bacterias.

El empleo de *Spirulina* para la alimentación no es algo nuevo, puesto que existen evidencias de que los aztecas consumían *Spirulina* procedente del lago Texcoco. Asimismo otras culturas de la zona del lago Chad, como los Kanenmbu, también incluían en su dieta habitual *Spirulina* en forma de galletas de microalgas desecadas al sol.

En España, *Spirulina* habita de forma salvaje en el Parque Nacional de Doñana (Huelva) cuya población junto con otras cianofitas es la dominante en los primeros meses de verano desplazando a algas clorofitas como parte del fitoplancton principalmente en la laguna de Santa Olalla (⁹⁸Siljeström, Moreno *y col.*, 1993). A pesar de que esta microalga no es originaria de nuestro país la hipótesis más aceptada es que llegó transportada por flamencos desde las lagunas volcánicas africanas en sus migraciones, puesto que es en la superficie de dichas lagunas donde crece con mayor profusión, debido a la ausencia de competidores provocada por la alcalinidad y salinidad de sus aguas.

A pesar de que la humanidad conoce esta microalga desde hace siglos, pero hasta la última mitad del siglo XX cuando empezó a utilizarse industrialmente. De hecho, su cultivo industrial no se inició hasta 1962 en la zona del Chad. Se trata de un cultivo idóneo para zonas áridas en las que la salinidad del agua la hace no-apta para su empleo agrícola tradicional.

Hoy por hoy, su principal empleo es para alimentación y mayoritariamente se consume en crudo en forma de tabletas de *Spirulina* prensada. De hecho, es muy fácil encontrarla en las zonas de suplementos dietéticos de los supermercados. Pero además, *Spirulina* se emplea como ingrediente de algunas pastas y bebidas. Sus principales consumidores son las personas seguidoras de dietas vegetarianas, debido a dos características: su elevado contenido en proteínas de alto valor biológico y

su contenido en vitamina B₁₂ (⁹³Abalde, Cid y col., 1995). También se emplea como fuente de pigmentos como son la ficocianina o xantofilas o de ácidos grasos poliinsaturados (⁹⁵Cohen, 1999). Debido al alto contenido en proteínas también se baraja el reemplazo de proteína de soja con Spirulina para alimentación animal.

Sus características nutricionales son las siguientes (⁹³Abalde, Cid y col., 1995):

- ✱ Proteínas: alrededor de un 65% en peso seco está formado por proteínas. Lo más importante de éstas es su composición de aminoácidos ya que no sólo contiene todos los esenciales sino que además su biodisponibilidad es muy alta. Por ejemplo, para la lisina se ha descrito un 85% de biodisponibilidad (⁹³Abalde, Cid y col., 1995).
- ✱ Hidratos de carbono: entre un 8 y un 14% principalmente en forma de polisacáridos de los que sus monómeros mayoritarios son glucosa, galactosa, manosa y ribosa.
- ✱ Lípidos: aproximadamente 6%, pero tanto su cantidad como composición varía en función de las condiciones de cultivo, principalmente luz y nitrógeno. Si la luz es escasa aumentará el contenido de lípidos como reserva de energía. En la Tabla I-5 se muestra la composición media de ácidos grasos de *Spirulina platensis*.

Tabla I-5.- Composición de ácidos grasos de *Spirulina platensis* (⁹³Abalde, Cid y col., 1995).

Tipo de ácidos grasos	Porcentaje respecto al total
Saturados	48,2
Monoinsaturados	13,6
C16 poliinsaturados	1,2
18:2 ω6 (Ác. linoleico)	14,5
18:3 ω6 (Ác. linolénico)	21,1
18:3 ω3 (Ác. α-linolénico)	0,3
20:3	0,4

- ✱ Ácidos Nucleicos: su bajo contenido en ácidos nucleicos en comparación con la de otras microalgas hace de Spirulina un producto idóneo para suplementación en pacientes con antecedentes o predisposición a la hiperuricemia (gota), puesto que en el metabolismo de los ácidos nucleicos se genera ácido úrico.
- ✱ Vitaminas: al tratarse de organismos fotoautótrofos poseen elevadas concentraciones de pigmentos, entre ellos β-caroteno, esto es, provitamina A. Además, Spirulina es el organismo no animal con mayor contenido en vitamina B12 o cobalamina. En la Tabla I-6 se presenta una relación de la composición media de vitaminas de Spirulina.

Tabla I-6.- Composición de vitaminas de *Spirulina platensis*, expresado en mg/kg (⁹³Abalde, Cid y col., 1995).

Vitamina	Contenido (mg/kg)
Vitamina A	840
Tiamina (B1)	44
Riboflavina (B2)	37
Piridoxina (B6)	3
Cobalamina (B12)	7
Ác. Ascórbico (C)	80
α -Tocoferol (E)	12
Biotina	0,3
Ác. fólico y folatos	0,4
Ác. Pantoténico	13

2.5.2. *Dunaliella salina*

Dunaliella es un alga verde (género Chlorophyta, familia Polyblepharidaceae) unicelular biflagelado (⁹⁹Chidambara Murthy, Vanitha y col., 2005). Este microorganismo fue descrito por primera vez en 1838 por Michael Felix Dunal, a quien debe su nombre (¹⁰⁰Oren, 2005). La principal característica de *Dunaliella salina* es su capacidad para crecer en ambientes hipersalinos (incluso 30% de salinidad). De hecho, se ha convertido en un modelo para el estudio de la adaptación de seres vivos a ese tipo de ambientes. Además, la acumulación masiva de β -caroteno por parte de algunas cepas ha despertado gran interés a la hora de diseñar aplicaciones biotecnológicas.

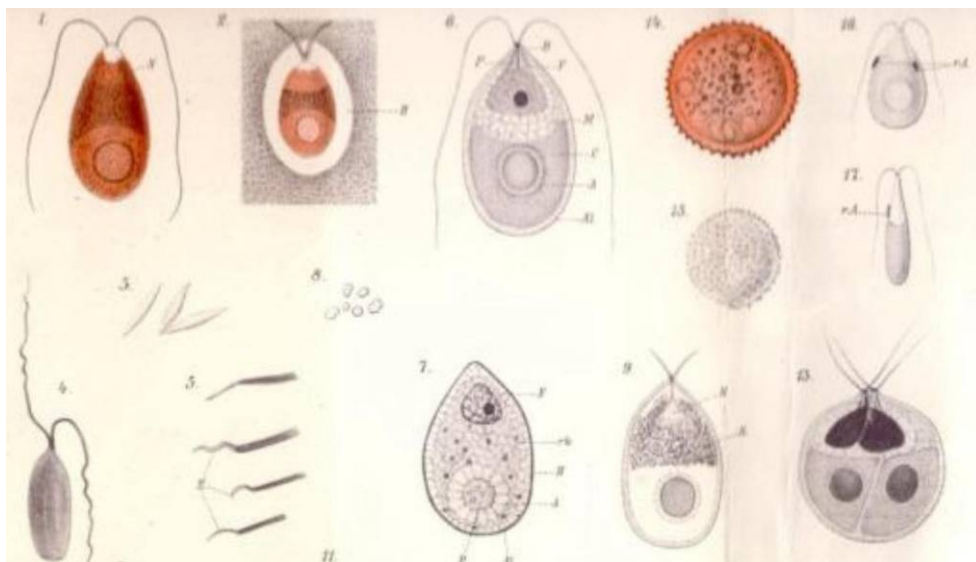


Fig. I-8.- Primeros dibujos de *Dunaliella salina*, realizados por Hamburger en 1905 (¹⁰⁰Oren, 2005).

Si bien la composición química varía enormemente en función de las condiciones de cultivo, al igual que en casi todas las microalgas, en líneas generales se puede destacar los siguientes compuestos (¹⁰¹Borowitzka & Borowitzka, 1988):

- ✖ Hidratos de carbono: hasta un 70% en peso seco entre mono, di y polisacáridos. La producción y almacenamiento de hidratos de carbono aumenta en condiciones de carencia

de nitrógeno. Asimismo, es destacable la acumulación de glicerol en condiciones de salinidad para mantener la ósmosis.

- ✖ **Lípidos:** el contenido de sustancias lipídicas puede variar entre 6 y 15% en función de la salinidad del medio de cultivo con proporciones similares de lípidos polares y neutros. Entre los ácidos grasos destaca la presencia de 16:0, 16:1, 16:4, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3. Los principales componentes de la fracción lipídica son isómeros de β -caroteno, pero también es destacable la presencia de mono y digalactosilgliceroles.
- ✖ **Proteínas:** el contenido en proteínas puede alcanzar hasta un 50% en peso seco, no obstante, si *Dunaliella salina* ha crecido en condiciones de hipersalinidad, el contenido en proteínas disminuye hasta el 30% debido al aumento en la concentración de glicerol intracelular para poder mantener la ósmosis. En la Tabla I-7 se puede ver la composición de aminoácidos de *Dunaliella salina*.

Tabla I-7.- Composición en aminoácidos en *Dunaliella salina* (¹⁰¹Borowitzka & Borowitzka, 1988).

Aminoácido	g/100 g de proteína
Alanina	6,3 – 12,9
Arginina	0,9 – 5,2
Ác. Aspártico	2,5 – 10,7
Cisteína	Trazas
Ác. Glutámico	7,9 – 11,9
Glicina	9,5 – 13,3
Histidina	1,2 – 8,8
Isoleucina	2,3 – 4,2
Leucina	5,0 – 17,6
Lisina	4,8 – 33,9
Metionina	Trazas
Fenilalanina	1,4 – 5,4
Prolina	4,2 – 8,8
Serina	6,3 – 8,6
Treonina	2,5 – 6,0
Triptófano	Nd
Tirosina	Trazas - 1,9
Valina	3,6 – 5,8

- ✖ **Vitaminas:** se han descrito además de pro-vitamina A (β -caroteno), otras vitaminas tales como tiamina, piridoxina, riboflavina y niacina.
- ✖ **Pigmentos:** principalmente se acumulan en los cloroplastos. *Dunaliella* pertenece al género de las algas verdes, cuyo principal pigmento es la clorofila. No obstante cuando crece en condiciones de hipersalinidad el contenido en carotenoides aumenta enormemente, especialmente los isómeros cis-trans de β -caroteno (all-trans, 9-cis, 15-cis y 13-cis

principalmente). Asimismo, es destacable la presencia de otros carotenoides como α -caroteno, luteína y zeaxantina.

Tal y como se ha comentado, *Dunaliella* presenta la mayor concentración de β -caroteno dentro de las microalgas, pudiendo llegar a representar hasta un 14% en peso seco. Esta acumulación está fuertemente favorecida por factores como la salinidad del medio, alta temperatura o intensidad de luz.

Ben-Amotz realizó una interesante revisión acerca de los métodos de cultivo industrial de *Dunaliella* clasificándolos en cuatro tipos (¹⁰²Ben-Amotz, 2004):

- ✖ Cultivo extensivo: en esta modalidad no se utilizan condiciones mínimas de nutrientes para inducir estrés en las condiciones de cultivo. Para proteger al cultivo de microalgas de contaminaciones de otros organismos, o ataques de depredadores, se utilizan concentraciones muy elevadas de sal. De esta manera se ha comprobado que se puede producir industrialmente 1 g de β -caroteno por cada m³ de cultivo. Como desventaja, este método requiere que el área para el cultivo sea muy extensa, si bien los costes asociados a su mantenimiento son muy bajos.
- ✖ Cultivo intensivo: en esta modalidad productiva se controlan todas las condiciones de crecimiento celular. De esta manera, pese a que se necesitan instalaciones mas sofisticadas, se pueden conseguir unos 5-15 g de β -caroteno por cada m³. Algunas plantas actuales, que se encuentran predominantemente en Israel con extensiones de hasta 50.000 m², pueden producir unos 3.659 kg de β -caroteno al año.
- ✖ Cultivo semi-intensivo: es el que se emplea mayoritariamente en Australia y en China. Hay un control, aunque no exhaustivo, de las condiciones de cultivo y normalmente los cultivos son de gran tamaño.
- ✖ Cultivo altamente intensivo: se caracteriza por llevarse a cabo en fotobiorreactores cerrados. Actualmente se encuentra en fase de desarrollo industrial ya que sólo se han conseguido diseños pilotos de este tipo de reactores. Este sistema se ha utilizado, por ejemplo, para investigar el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de β -caroteno (¹⁰³Guerrero, 2005).

2.5.3. *Chaetoceros muelleri*

Chaetoceros muelleri es una microalga perteneciente al género de las diatomeas. Probablemente sea la microalga más empleada en las granjas de acuicultura de crustáceos debido a su interesante perfil lipídico. Principalmente se emplea en la alimentación de las fases larvarias. Además, se utiliza como alimento del zooplankton que servirá a su vez de alimento del que se nutrirán las fases juveniles y adultas (¹⁰⁴Brown, Jeffrey y col., 1997).

Las diatomeas son algas unicelulares pertenecientes a la Clase *Bacillariophyceae*. Presentan una envoltura silícica externa que hace que su forma se conserve de manera permanente. En función de la simetría que presente la estructura de sílice, las diatomeas se dividen en dos grupos: aquellas de simetría radial (Orden Biddulphiales o Centrales) y las de simetría bilateral (Orden Bacillariales o Pennales). *Chaetoceros* pertenece al grupo de las Biddulphiales, a veces se las puede encontrar agrupadas formando colonias espirales tal y como se aprecia en la Fig. I-9.



Fig. I-9.- Diversas micrografías de *Chaetoceros*.

Se han descrito relaciones ecológicas antagónicas entre ciertas bacterias y *Chaetoceros*, debido a la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de *Chaetoceros* (¹⁰⁵Viso, Pesando *y col.*, 1987). Además, Sakata describió la relación inversa, aisló una cepa identificada como *Saprospira* sp. SS-K1 capaz de producir la lisis de *Isochrysis* y *Chaetoceros* (¹⁰⁶Sakata, 1990).

Las principales características nutricionales de *Chaetoceros* son las siguientes (¹⁰⁷Brown, 1991; ¹⁰⁴Brown, Jeffrey *y col.*, 1997), no obstante éstas pueden variar en función de las condiciones de cultivo:

- ✗ **Hidratos de carbono:** el contenido medio en hidratos de carbono ronda el 5% en peso seco, con un 88% de ellos en forma de polisacáridos. La glucosa es el monosacárido mayoritario llegando a representar casi el 60% de todos los azúcares, siendo destacable el contenido en galactosa y mucosa.
- ✗ **Proteínas:** *Chaetoceros* posee un 35% en peso seco de proteínas. Sus principales aminoácidos esenciales son leucina y fenilalanina, además es destacable su contenido en ácido glutámico llegando a representar el 10% del total de aminoácidos.
- ✗ **Pigmentos:** el principal pigmento fotosintético de *Chaetoceros* es clorofila-a, alcanzando un 3% en peso seco.
- ✗ **Lípidos:** el contenido de lípidos de *Chaetoceros* es aproximadamente un 16%, mayoritariamente compuestos por triglicéridos, pero con un alto contenido en ácidos grasos libres (~6%). Es destacable la presencia de un elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados (27% de moninsaturados, 39% de poliinsaturados). Aunque pequeña, es destacable la presencia de colesterol, algo común a las microalgas diatomeas, pero no así entre otros organismos vegetales.

Tabla I-8.- Composición de aminoácidos de *Chaetoceros muelleri* (gracilis) en porcentaje en peso del total de aminoácidos (¹⁰⁷Brown, 1991).

	Aminoácido	Contenido medio
Esenciales	Arginina	7,0
	Histidina	2,5
	Isoleucina	7,6
	Lisina	5,4
	Metionina	2,5
	Fenilalanina	7,5
	Prolina	6,7
	Treonina	6,3
	Triptófano	1,7
	Valina	6,6
No Esenciales	Alanina	7,3
	Ác. Aspártico	8,5
	Cisteína	0,6
	Ác. Glutámico	10,0
	Glicina	5,4
	Hidroxiprolina	0,4
	Ornitina	0,4
	Serina	7,0
	Tirosina	5,7
	Ác. γ-aminobutírico	0,8

2.5.4. Antecedentes de extractos de microalgas

Desde finales de los años 70 se han desarrollado diversos procesos para la obtención de extractos de algas, fundamentalmente pigmentos, basados en la extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos, como por ejemplo, mezclas cloroformo:metanol o acetona (¹⁰⁸Rebeller, Yout y col., 1982; ¹⁰⁹Ruane, 1977). Adicionalmente, algunas operaciones como la ultrafiltración se añaden al proceso para mejorar la selectividad del mismo. Otros estudios destinados a conseguir un adecuado fraccionamiento de compuestos de diversas polaridades emplean a su vez elevadas cantidades de disolventes orgánicos y complejas etapas posteriores de concentración (¹¹⁰Vincenzini, Bocci y col., 1983). Otras investigaciones más recientes destinados a la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a partir de microalgas se basan en procesos de saponificación (empleando mezclas de hexano y etanol), formación de complejos con urea y aislamiento, utilizando HPLC semipreparativa en fase inversa, con metanol y agua como fase móvil (¹¹¹Cartens, Molina Grima y col., 1996; ¹¹²Gimenez, Ibáñez y col., 1998; ¹¹³Ibáñez Gonzalez, Robles Medina y col., 1998). Con el objetivo de mejorar los rendimientos de las extracciones, estos mismos investigadores desarrollaron un proceso más complejo que incluía una etapa de transesterificación después de la extracción y previa a la separación por HPLC semipreparativa con columnas iónicas (¹¹⁴Belarbi, Molina Grima y col., 2000; ¹¹⁵Guil-Guerrero, Belarbi y col., 2000).

Algunos extractos de microalgas ricos en carotenos están reconocidos por la legislación española como E-160, concretamente están admitidos los carotenos procedentes de *Dunaliella salina*^f y de *Blakeslea trispora*^g, en ambos casos el dióxido de carbono está admitido como disolvente para su extracción al igual que acetona, metiletilcetona, metanol, etanol, propan-2-ol, hexano y diclorometano. Sin embargo cuando para su extracción se emplea CO₂ no hay necesidad de realizar un análisis de residuos de disolvente mientras que para los otros sí es necesario garantizar que el residuo no supera los 50 mg/kg de la suma de acetona, metiletilcetona, metanol, propan-2-ol, hexano y etanol, o bien, 10 mg/kg de diclorometano^d.

2.5.5. SFE y microalgas

Tal y como se comentó, los principales compuestos de interés presentes en las microalgas son los relacionados con la fotosíntesis (carotenoides, clorofilas y proteínas), compuestos lipídicos (ácidos grasos polinsaturados, glicolípidos) así como otros compuestos relacionados con la pared celular.

Son destacables la, relativamente alta, solubilidad y estabilidad de dichos compuestos en CO₂ supercrítico (especialmente carotenoides, clorofilas y ácidos grasos), por lo que la SFE se convierte en una técnica ideal para la obtención de extractos de microalgas. Además, muchos de estos compuestos se relacionan con interesantes actividades: antioxidante, antimicrobiana o incluso antiviral (⁹⁴Borowitzka, 1999). Por este motivo la tiene, en la actualidad, un gran interés para la I+D alimentaria.

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) reúne todas las ventajas necesarias para sustituir a los procesos tradicionales de obtención de compuestos naturales con propiedades funcionales, puesto que, como ya se comentó, opera en ausencia de oxígeno empleando CO₂ como agente extractante y no un disolvente orgánico. Además, se evitan los problemas asociados a la eliminación de disolventes empleando altas temperaturas, como, por ejemplo, oxidaciones no deseadas y reducción de la actividad funcional de los extractos.

El empleo de fluidos supercríticos para obtener compuestos funcionales a partir algas y microalgas no es algo nuevo. Ya en la década de los ochenta, con el auge de los métodos de preparación de muestra, se realizaron estudios en este sentido. Los primeros compuestos estudiados fueron los ácidos grasos (¹¹⁶Choi, Nakhost *y col.*, 1987). Pero no fue hasta mediados de los noventa cuando comenzó el estudio en microalgas, concretamente de *Chlorella vulgaris* (¹⁵Mendes, Fernandes *y col.*, 1995). A partir de entonces se han realizado diversos estudios (¹³Careri, Furlattini *y col.*, 2001; ¹¹⁷Majewski, Perrut *y col.*, 2000; ¹¹⁸Mendes, Nobre *y col.*, 2003), incluso se ha llegado a calificar la extracción con fluidos supercríticos como “el método más apropiado para la obtención de ácidos grasos, pigmentos, etc., a partir de biomasa de microalgas para su empleo como ingredientes alimentarios” (¹¹⁹Guil-Guerrero, Navarro-Juarez *y col.*, 2004).

^f Real Decreto 1373/2000, de 19 de julio (BOE n. 173 de 20/7/2000), por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios

^g Orden SCO/4223/2004, de 16 de diciembre (BOE n. 312 de 28/12/2004), por la que se modifica el anexo del Real Decreto 2107/1996, de 20 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios

2.5.5.1. Aplicaciones industriales y patentes

En los últimos años se han desarrollado diferentes aplicaciones industriales, ejemplo de ello son Phasex, Algatech o U.S. Nutra (Valensa), que comercializan astaxantina a partir de *Hematococcus pluvialis*, o bien, diferentes patentes en las que se emplea explícitamente la SFE para la obtención de extractos de microalgas como por ejemplo:

- ✖ “Production of lipid containing carotinoids from algae” (¹²⁰Yamaguchi, Yamamoto *y col.*, 1985): diseño de un equipo y un proceso de extracción empleando CO₂ supercrítico para la obtención de carotenoides a partir de algas y microalgas;
- ✖ “Process for separating docosahexaenoic acid or ester thereof from marine microalgae” (¹²¹Tokio, Nobuyuki *y col.*, 1994): proceso de obtención de DHA a partir de microalgas consistente en hidrólisis de la biomasa, y extracción mediante varios pasos entre los que se incluye la SFE;
- ✖ “Process for continuous production and extraction of carotenoids from natural sources” (¹²²Hejazi, Wijffels *y col.*, 2003): método de extracción tanto SFE como extracción líquida en contracorriente de cultivos acuosos vivos de microalgas;
- ✖ “Preparation of microbial polyunsaturated fatty acid containing oil from pasteurised biomass” (¹²³Bijl, Wolf *y col.*, 2004): proceso de obtención de PUFA's a partir de biomasa inerte de *Mortierella* y *Cryptocodinium* empleando extracción supercrítica;
- ✖ “Oil mixture of natural bioactive ingredients for the preparation of an enriched food product” (¹²⁴Reglero, Señorans *y col.*, 2006): mezcla de extracto supercrítico de plantas y lípidos funcionales estable para ser incluido como ingrediente alimentario;
- ✖ “Green algal extract containing astaxanthin having high storage stability” (¹²⁵Murakami & Ishikura, 2007): proceso de estabilización de un extracto supercrítico rico en astaxantina obtenido mediante SFE;

Pero también se han desarrollado diversas técnicas de extracción para la obtención de ingredientes funcionales de origen marino, seguidamente se detallan las patentes más relevantes del último año:

- ✖ “Extraction of highly unsaturated lipids with liquid dimethyl ether” (¹²⁶Catchpole, Grey *y col.*, 2007): se trata de un proceso de obtención de aceites marinos (animales y vegetales) empleando dimetil éter en condiciones cuasi-críticas;
- ✖ “Use of *Phaeodactylum* algae extract as cosmetic agent promoting the proteasome activity of skin cells and cosmetic composition comprising same” (¹²⁷Nizard, Friguet *y col.*, 2007): proceso de obtención de un aceite cosmético mediante la SFE del alga *Phaeodactylum sp.* y purificado con disolventes polares;
- ✖ “Arachidonic acid and methods for the production and use thereof” (¹²⁸Kyle, 2007): proceso de cultivo de *Pythium insidiosum* enriquecido en ácido araquidónico y su

purificación empleando diversas técnicas entre ellas SFE con el objeto de incluirlo en alimentos infantiles, este proceso se realiza y comercializa a través de DSM Food Specialities;

- ✱ “Production of ultrapure EPA and polar lipids from largely heterotrophic culture”⁽¹²⁹⁾ Geiringer & Griffiths, 2008): proceso de producción de un cultivo de la diatomea *Nitzschia laevis* enriquecida en EPA y lípidos polares y su posterior purificación empleando cromatografía supercrítica preparativa;

2.5.5.2. Páginas web de interés

En la siguiente Tabla I-9 se muestran algunas de las páginas web más interesantes a las que se puede acceder a fecha de febrero de 2008 sobre la investigación y aplicaciones industriales de la SFE y microalgas.

Tabla I-9.- Algunas páginas web de interés relacionadas con la SFE y las microalgas, así como sus aplicaciones industriales (Fecha de acceso marzo 2008)

Dirección:	Descripción
http://www.phasex4scf.com	Phasex Corporation
http://www.algatech.com	Algatech Ltd
http://www.valensa.com	Valensa (US Nutra)
http://www.martek.com	Martek Bioscience
http://www.nutrinova.com	Nutrinova
http://www.pharmamar.com	Pharmamar
http://www.seaweedcanarias.com	Seaweed Canarias
http://www.ediblemicroalgae.com/intro/	Información sobre microalgas comestibles
http://www.easyalgae.com/index.asp	Fitoplancton Marino S.L.
http://www.algatech.com/	AlgaTechnologies
http://www.algaebase.org/	Base de datos sobre algas y microalgas
http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/index.html	Servidor de información general de Cianobacterias
http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/cyano.html	Genomas de Cianobacterias
http://www.phycology.net/	Portal de información sobre ficología
http://www.spirulinasource.com/earthfoodch1b.html	Cultivo tradicional de Spirulina
http://www.bioaqua.net/mnp/public-research/groups.asp	Relación internacional de centros de investigación sobre microalgas
http://www.carotenoids.org	Sociedad internacional para la investigación en carotenoides
http://www.icmab.es/flucomp	Red temática de expertos en fluidos comprimidos
http://www.isasf.net	Sociedad Internacional para el Avance de los fluidos supercríticos
http://www.criticalprocesses.com/index.htm	Calculadoras de propiedades termodinámicas
http://www.nasa.gov/vision/earth/technologies/harvestingmars.html http://www.iapws.ca/05Fra-poster.pdf	Dos ejemplos de fluidos supercríticos en la naturaleza
http://www.ars.usda.gov/nutrientdata	Bases de datos sobre diversas materias alimentarias

3. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Luque de Castro, M.D.; Valcarcel, M. & Tena, M.T.** (1993). *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. España, Reverté
- 2.- **Moyler, D.A.** (1993). Extraction of flavours and fragrances with compressed CO₂. *Extraction of natural products using near-critical solvents*. King, M. B. and T. R. Bott. Glasgow, UK, Blackie Academic & Professional: 155.
- 3.- **King, M.B. & Bott, T.R.** (1993). *Extraction of natural products using near-critical solvents*. Glasgow, Blackie Academic & Professional
- 4.- **Roselius, W.; Vitzthum, O. & Hubert, P.** (1974). "Method for the production of caffeine-free coffee extract". United States, *Patente*: US3843824
- 5.- **Zosel, K.O.R.** (1974). "Process for recovering caffeine". United States, *Patente*: US3806619
- 6.- **Mukhopadhyay, M.** (2000). *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Boca Ratón, Florida, CRC Press 339.
- 7.- **Herrero, M.; Cifuentes, A. & Ibanez, E.** (2006). "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review". *Food Chemistry* 98(1): 136-148.
- 8.- **Marr, R. & Gamse, T.** (2000). "Use of supercritical fluids for different processes including new developments--a review". *Chemical Engineering and Processing* 39(1): 19-28.
- 9.- **Wang, L. & Weller, C.L.** (2006). "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants". *Trends in Food Science & Technology* 17(6): 300-312.
- 10.- **Baysal, T.; Ersus, S. & Starmans, D.A.J.** (2000). "Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5507-5511.
- 11.- **Vasapollo, G.; Longo, L.; Rescio, L. & Ciurlia, L.** (2004). "Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent". *The Journal of Supercritical fluids* 29: 87-96.
- 12.- **Tapiero, H.; Townsend, D.M. & Tew, K.D.** (2004). "The role of carotenoids in the prevention of human pathologies". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58: 100-110.
- 13.- **Careri, M.; Furlattini, L.; Mangia, A.; Musci, M.; Anklam, E.; Theobald, A. & von Holst, C.** (2001). "Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach". *Journal of Chromatography A* 912(1): 61-71.
- 14.- **Cserhàti, T. & Forgacs, E.** (2001). "Liquid chromatographic separation of terpenoid pigments in foods and food product (Review)". *Journal of Chromatography A* 936: 119-137.
- 15.- **Mendes, R.L.; Fernandes, H.L.; Coelho, J.P.; Reis, E.C.; Cabral, J.M.S.; Novais, J.M. & Palavra, A.F.** (1995). "Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*". *Food Chemistry* 53(1): 99-103.
- 16.- **de Lucas, A.; Martinez de la Ossa, E.; Rincon, J.; Blanco, M.A. & Gracia, I.** (2002). "Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves". *The Journal of Supercritical Fluids* 22(3): 221-228.
- 17.- **Tabera, J.; Guinda, Á.; Ruiz-Rodríguez, A.; Señoráns, F.J.; Ibanez, E.; Albi, T. & Reglero, G.** (2004). "Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(15): 4774-4779.
- 18.- **Chafer, A.; Pascual-Martí, M.C.; Salvador, A. & Berna, A.** (2005). "Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin". *Journal of Separation Science* 28(16): 2050-2056.
- 19.- **Lang, Q.; Wai, C.M.; Ang, C.Y.W.; Cui, Y.; Heinze, T.M.; Mattia, A. & Dinovi, M.** (2004). "Sample preparation and determination of ginkgo terpene trilactones in selected beverage, snack, and dietary supplement products by liquid chromatography with evaporative light-scattering detection". *Journal of AOAC International* 87(4): 815-826.
- 20.- **Lehotay, S.J.** (1997). "Supercritical fluid extraction of pesticides in foods". *Journal of Chromatography A* 785(1-2): 289-312.
- 21.- **Mendiola, J.A.; Herrero, M.; Cifuentes, A. & Ibanez, E.** (2007). "Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications". *Journal of Chromatography A* 1152(1-2): 234-246.
- 22.- **Rodríguez-Bernaldo de Quiros, A. & Costa, H.S.** (2006). "Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review". *Journal of Food Composition and Analysis* 19(2-3): 97-111.
- 23.- **Turner, C.; King, J.W. & Mathiasson, L.** (2001). "Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis (Review)". *Journal of Chromatography A* 936: 215-237.

- 24.- Wang, L. & Muttucumaru, S. (2002). "Separation of biosynthetic polyunsaturated fatty acid (PUFA) with supercritical fluid". *Biotechnology Annual Review* 8: 167-181.
- 25.- Goncalves, C.; Carvalho, J.J.; Azenha, M.A. & Alpendurada, M.F. (2006). "Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1110(1-2): 6-14.
- 26.- Kreuzig, R.; Koinecke, A. & Bahadir, M. (2000). "Use of supercritical fluid extraction in the analysis of pesticides in soil". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 43(1-3): 403-409.
- 27.- Nerin, C.; Batlle, R.; Sartaguda, M. & Pedrocchi, C. (2002). "Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides and some metabolites in frogs from National Park of Ordesa and Monte Perdido". *Analytica Chimica Acta* 464(2): 303-312.
- 28.- Buszewski, B.; Buszewska, T.; Szumski, M. & Siepak, J. (2003). "Simultaneous determination of phenols and polyaromatic hydrocarbons isolated from environmental samples by SFE-SPE-HPLC". *Chemia Analityczna* 48(1): 13-25.
- 29.- Fuoco, R.; Giannarelli, S.; Onor, M.; Ceccarini, A. & Carli, V. (2005). "Optimized cleanup methods of organic extracts for the determination of organic pollutants in biological samples". *Microchemical Journal* 79(1-2): 69-76.
- 30.- Librando, V.; Tomaselli, G. & Tringali, G. (2005). "Optimization of supercritical fluid extraction by carbon dioxide with organic modifiers of polycyclic aromatic hydrocarbons from urban particulate matter". *Annali di Chimica* 95(3-4): 211-216.
- 31.- Wong, P.K. & Wang, J. (2001). "The accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in lubricating oil over time - A comparison of supercritical fluid and liquid-liquid extraction methods". *Environmental Pollution* 112(3): 407-415.
- 32.- Prokopczyk, B.; Hoffmann, D.; Bologna, M.; Cunningham, A.J.; Trushin, N.; Akerkar, S.; Boyiri, T.; Amin, S.; Desai, D.; Colosimo, S.; Pittman, B.; Leder, G.; Ramadani, M.; Henne-Bruns, D.; Beger, H.G. & El-Bayoumy, K. (2002). "Identification of tobacco-derived compounds in human pancreatic juice". *Chemical Research in Toxicology* 15(5): 677-685.
- 33.- Arancibia, V.; Valderrama, M.; Madariaga, A.; Zuñiga, M.C. & Segura, R. (2003). "Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection". *Talanta* 61(3): 377-383.
- 34.- Senorans, F.J. & Ibanez, E. (2002). "Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography". *Analytica Chimica Acta* 465(1): 131-144.
- 35.- McAvoy, Y.; Backstrom, B.; Janhunen, K.; Stewart, A. & Cole, M.D. (1999). "Supercritical fluid chromatography in forensic science: a critical appraisal". *Forensic Science International* 99(2): 107-122.
- 36.- Roth, M. (2004). "Determination of thermodynamic properties by supercritical fluid chromatography". *Journal of Chromatography A* 1037(1): 369-391.
- 37.- Berry, D. (2000). "New food solutions from extrusion". *Prepared Foods* 169: 67-72.
- 38.- Rizvi, S.S.H.; Mulvaney, S.J. & Sokhey, A.S. (1995). "The combined application of supercritical fluid and extrusion technology". *Trends in Food Science & Technology* 6(7): 232-240.
- 39.- Jessop, P.G. & Leitner, W., Eds. (1999). *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*. Weinheim, Wiley & sons.
- 40.- Knez, Z. & Habulin, M. (2002). "Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review". *The Journal of Supercritical Fluids* 23(1): 29-42.
- 41.- Krishna, S.H. (2002). "Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media". *Biotechnology Advances* 20(3-4): 239-267.
- 42.- Matsuda, T.; Harada, T. & Nakamura, K. (2004). "Organic synthesis using enzymes in supercritical carbon dioxide". *Green Chemistry* 6(9): 440-444.
- 43.- Turner, C.; King, J.W. & McKeon, T. (2004). "Selected uses of enzymes with critical fluids in analytical chemistry". *Journal of Aoac International* 87(4): 797-810.
- 44.- Bauza, R.; Ríos, A.; Gómez-Hens, A. & Valcárcel, M. (2004). "Supercritical fluid immunoextraction: A new approach for immunoassay automation". *Analytica Chimica Acta* 518(1-2): 151-156.
- 45.- Fricke, J. & Tillotson, T. (1997). "Aerogels: production, characterization, and applications". *Thin Solid Films* 297(1-2): 212-223.
- 46.- Moreno-Castilla, C. & Maldonado-Hodar, F.J. (2005). "Carbon aerogels for catalysis applications: An overview". *Carbon* 43(3): 455-465.
- 47.- Fabrizioli, P.; Burgi, T. & Baiker, A. (2002). "Environmental Catalysis on Iron Oxide-Silica Aerogels: Selective Oxidation of NH₃ and Reduction of NO by NH₃". *Journal of Catalysis* 206(1): 143-154.

- 48.- Maury, S.; Buisson, P.; Perrard, A. & Pierre, A.C. (2004). "Influence of the sol-gel chemistry on the activity of a lipase encapsulated in a silica aerogel". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 29(1): 133-148.
- 49.- Pierre, A. & Buisson, P. (2001). "Influence of the porous texture of silica gels on the enzymatic activity of lipases in esterification reactions". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11(4): 639-647.
- 50.- Pasquali, I.; Bettini, R. & Giordano, F. (2006). "Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceutics". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27(4): 299-310.
- 51.- Hirunsit, P.; Huang, Z.; Srinophakun, T.; Charoenchaitrakool, M. & Kawi, S. (2005). "Particle formation of ibuprofen-supercritical CO₂ system from rapid expansion of supercritical solutions (RESS)". *Powder Technology* 154(2): 83-94.
- 52.- Ranjit, T. & Ram, B.G. (2006). "Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process". *International Journal of Pharmaceutics* 308(1): 190-199.
- 53.- Thakur, R. & Gupta, R.B. (2006). "Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC)". *International Journal of Pharmaceutics* 308(1): 190-199.
- 54.- Letourneau, J.J.; Vigneau, S.; Gonus, P. & Fages, J. (2005). "Micronized cocoa butter particles produced by a supercritical process". *Chemical Engineering and Processing* 44(2): 201-207.
- 55.- Ozge Guney, A.A. (2002). "Synthesis of controlled-release products in supercritical medium". *AIChE Journal* 48(4): 856-866.
- 56.- Reverchon, E. & Antonacci, A. (2007). "Polymer microparticles production by supercritical assisted atomization". *Journal of Supercritical Fluids* 39(3): 444-452.
- 57.- Wang, Y.; Pfeffer, R.; Dave, R. & New Jersey Institute Of, T. (2004). "Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical antisolvent process". United States, *Patente*: WO2004091571.
- 58.- Wang, Y.; Wang, Y.; Yang, J.; Pfeffer, R.; Dave, R. & Michniak, B. (2006). "The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery". *Powder Technology* 164(2): 94-102.
- 59.- Yue, B.; Yang, J.; Wang, Y.; Huang, C.Y.; Dave, R. & Pfeffer, R. (2004). "Particle encapsulation with polymers via in situ polymerization in supercritical CO₂". *Powder Technology* 146(1): 32-45.
- 60.- Catchpole, O.J.; Grey, J.B.; Mitchell, K.A. & Lan, J.S. (2004). "Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture". *The Journal of Supercritical Fluids* 29(1): 97-106.
- 61.- Mende, D.A. & Catchpole, O.J. (2005). "A method of extracting totarol and/or a product containing totarol". New Zealand, *Patente*: WO2005073154.
- 62.- Goldberg, I. (1996). *Functional foods. Designer foods, pharmafood, nutraceuticals*. London, United Kingdom, Chapman and Hall
- 63.- Katan, M. & Roos, N. (2004). "Promises and Problems of Functional Foods". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44(5): 369-377.
- 64.- Coppens, P.; Fernandes da Silva, M. & Petmann, S. (2006). "European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods. A framework based on safety". *Toxicology* 221: 59-74.
- 65.- Madhavi, D.L.; Deshpande, S.S. & Salunkhe, D.K. (1996). *Food antioxidants*. New York, Marcel Dekker
- 66.- Urala, N. & Lahteenmaki, L. (2007). "Consumers' changing attitudes towards functional foods". *Food Quality and Preference* 18(1): 1-12.
- 67.- Langseth, L. (1995). *Oxidants, antioxidants and disease prevention*. Brussels, International Life Sciences Institute
- 68.- Baynes, J.W. (1991). "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes." *Diabetes* 40: 405-412.
- 69.- Garewal, H.S. (1997). *Antioxidants and disease prevention*. Boca Raton, Florida, CRC Press
- 70.- Rodrigo, J.; Fernandez, A.P.; Serrano, J.; Peinado, M.A. & Martinez, A. (2005). "The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia". *Free Radical Biology and Medicine* 39(1): 26-50.
- 71.- Alpay, Z.; Saed, G.M. & Diamond, M.P. (2006). "Female Infertility and Free Radicals: Potential Role in Adhesions and Endometriosis". *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 13(6): 390-398.
- 72.- Poon, H.F.; Calabrese, V.; Scapagnini, G. & Butterfield, D.A. (2004). "Free Radicals: Key to Brain Aging and Heme Oxygenase as a Cellular Response to Oxidative Stress". *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 59(5): M478-493.
- 73.- Cutler, R.G. (1991). "Antioxidants and aging". *American Journal of Clinical Nutrition* 53: 3735-3739.

- 74.- **Heinonen, I.M.; Meyer, A.S. & Frankel, E.N.** (1998). "Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low Density Lipoprotein and Liposome Oxidation". *Journal of agricultural and Food Chemistry* 46: 4107.
- 75.- **Rahimi, R.; Nikfar, S.; Larijani, B. & Abdollahi, M.** (2005). "A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59(7): 365-373.
- 76.- **Scheibmeir, H.D.; Christensen, K.; Whitaker, S.H.; Jegaethesan, J.; Clancy, R. & Pierce, J.D.** (2005). "A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses". *Intensive and Critical Care Nursing* 21(1): 24-28.
- 77.- **Packer, L.; Hiramatsu, M. & Yoshikawa, T.** (1999). *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. London, Academic Press
- 78.- **Hollingsworth, P.** (1998). "We all scream for...green tea?" *Food Technology* 52: 28.
- 79.- **Bast, A. & Haenen, G.R.M.M.** (2002). "The toxicity of antioxidants and their metabolites". *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11(3-4): 251-258.
- 80.- **Fogliano, V. & Vitaglione, P.** (2005). "Functional foods: Planning and development". *Molecular Nutrition and Food Research* 49(3): 256-262.
- 81.- **Halliwell, B.** (2000). "The antioxidant paradox". *The Lancet* 355(9210): 1179-1180.
- 82.- **Harris, L.J. & Moore, T.** (1929). "Hypervitaminosis and vitamin balance". *Journal of Biochemistry* 23(5): 1114-1121.
- 83.- **Kappus, H. & Diplock, A.T.** (1992). "Tolerance and safety of vitamin E: A toxicological position report". *Free Radical Biology and Medicine* 13(1): 55-74.
- 84.- **Mitchel, R.E.J. & McCann, R.** (1993). "Vitamin E is a complete tumor promoter in mouse skin". *Carcinogenesis* 14(4): 659-662.
- 85.- **Wang, X.D. & Russell, R.M.** (1999). "Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of β -carotene". *Nutrition Reviews* 57(9 I): 263-272.
- 86.- **Le Totour, B.** (1990). "Antioxidative activities of algal extract, synergistic effect with vitamine E". *Phytochemistry* 29(12): 3759-3765.
- 87.- **Wessels, M.; Konig, G.M. & Wright, A.D.** (2000). "New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of the three distinct samples of the sea hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife". *Journal of Natural Products* 63(7): 920-928.
- 88.- **Roginsky, V. & Lissi, E.A.** (2005). "Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food". *Food Chemistry* 92(2): 235-254.
- 89.- **Berkowitz, F.E.** (1995). "Antibiotic resistance in bacteria". *Southern Medical Journal* 88(8): 797-804.
- 90.- **Eloff, J.N.** (1998). "Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?" *Journal of Ethnopharmacology* 60(1): 1-8.
- 91.- **Bergey, D.H.; Garrity, G.M.; Boone, D.R.; Castenholz, R.W.; Brenner, D.J. & Krieg, N.R.** (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, Springer Verlag
- 92.- **Robles Medina, A.; Molina Grima, E.; Giménez Giménez, A. & Ibáñez González, M.J.** (1998). "Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids". *Biotechnology Advances* 16(3): 517-580.
- 93.- **Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Torres, E. & Herrero, C.** (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. A Coruña, Servicio de publicaciones de la Universidad da Coruña
- 94.- **Borowitzka, M.A.** (1999). Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. *Chemicals from microalgae*. Cohen, Z. London, UK, Taylor & Francis: 313-352.
- 95.- **Cohen, Z.** (1999). *Chemicals from microalgae*. London, Taylor & Francis
- 96.- **Van den Hoek, C.; Mann, D.G. & Jahns, H.M.** (1995). *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge, Cambridge University Press
- 97.- **Jensen, T.E.** (1993). *Cyanobacterial Ultrastructure*. Boca Ratón, Florida, CRC Press Inc. (ed.) 7-52.
- 98.- **Siljeström, P.; Moreno, A.; García-Fernandez, L.V. & Clemente, L.** (1993). "Diferenciación de unidades edáficas en base a imágenes 1M". *Revista de Teledetección* 2: 1-8.
- 99.- **Chidambara Murthy, K.N.; Vanitha, A.; Rajesha, J.; Swamy Mahadeva, M.; Sowmya, P.R. & Ravishankar, G.A.** (2005). "In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* -- a green microalga". *Life Sciences* 76(12): 1381-1390.
- 100.- **Oren, A.** (2005). "A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005". *Saline Systems (Open Access)* 1(2): 1-14, doi:10.1186/1746-1448-1-2.

- 101.- **Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J.** (1988). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge, Cambridge University Press
- 102.- **Ben-Amotz, A.** (2004). Industrial Production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Richmond, A. Oxford, Blackwell Science.
- 103.- **Guerrero, M.G.** (2005). "Photobioreactor for carotenoid production". *Industrial Bioprocessing* 27(2): 9.
- 104.- **Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Volkman, J.K. & Dunstan, G.A.** (1997). "Nutritional properties of microalgae for mariculture". *Aquaculture* 151(1-4): 315-331.
- 105.- **Viso, A.C.; Pesando, D. & Baby, C.** (1987). "Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture". *Botanica Marina* 330: 41-45.
- 106.- **Sakata, T.** (1990). "Occurrence of marine *Saprospira* sp. possessing algicidal activity for diatoms". *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1165.
- 107.- **Brown, M.R.** (1991). "The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145(1): 79-99.
- 108.- **Rebeller, M.; Yout, P. & Lonchamp, D.** (1982). "Process for selectively extracting dyestuffs contained in Cyanophyceae algae, the so-extracted dyestuffs and their use, particularly in foodstuffs." United States Patent, *Patente*: US4320050, FR2453199, JP55144868
- 109.- **Ruane, M.** (1977). "Extraction of caroteniferous material from algae". Australia, *Patente*: AU3400863B
- 110.- **Vincenzini, M.; Bocci, F.; Materassi, R. & Florenzano, G.** (1983). *Decoloration and fractionation of Spirulina biomass*. Progress in food engineering. Food Eng. Symp. 563.
- 111.- **Cartens, M.; Molina Grima, E.; Robles Medina, A.; Gimenez Gimenez, A. & J., I.G.** (1996). "Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73: 1025-1029.
- 112.- **Gimenez, A.; Ibáñez, M.J.; Robles, A.; Molina-Grima, E.; Garcia, S. & Esteban, L.** (1998). "Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20:5n-3) and arachidonic acids (20:4n-6) from the microalga *Porphyridium cruentum*". *Bioseparations* 7: 89-94.
- 113.- **Ibáñez Gonzalez, M.J.; Robles Medina, A.; Molina Grima, E.; Gimenez Gimenez, A.; Carstens, M. & Esteban Cerdán, L.** (1998). "Optimization of fatty acid extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75.
- 114.- **Belarbi, E.H.; Molina Grima, E. & Chisti, Y.** (2000). "A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Process Biochem. 35, 951". *Enzyme and Microbial Technology* 26(7): 516-529.
- 115.- **Guil-Guerrero, J.L.; Belarbi, E.H. & Reboloso Fuentes, M.M.** (2000). "Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum*". *Bioseparations* 9: 299-304.
- 116.- **Choi, K.J.; Nakhost, Z.; Krukonis, V.J. & Karel, M.** (1987). "Supercritical fluid extraction and characterization of lipids from algae *Scenedemus obliquus*". *Food Biotechnology* 1: 263-270.
- 117.- **Majewski, W.; Perrut, M. & Valderrama, J.O.** (2000). *Extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis by supercritical carbon dioxide*. Proceedings of the Seventh Meeting on Supercritical Fluid, Antibes, France.
- 118.- **Mendes, R.L.; Nobre, B.P.; Cardoso, M.T.; Pereira, A.P. & Palavra, A.F.** (2003). "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae". *Inorganica Chimica Acta* 356: 328-334.
- 119.- **Guil-Guerrero, J.L.; Navarro-Juarez, R.; López-Martínez, J.C.; Campra-Madrid, P. & Reboloso-Fuentes, M.M.** (2004). "Functional properties of the biomass of three microalgal species". *Journal of Food Engineering* 65(4): 511-517.
- 120.- **Yamaguchi, K.; Yamamoto, H.; Ando, N.; Murai, K. & Kajiyama, T.** (1985). "Production of lipid containing carotinoids from algae". (Iwatani & Co.) Japón, *Patente*: JP60207567
- 121.- **Tokio, I.; Nobuyuki, S.; Kenichi, U. & Daizo, T.** (1994). "Process for separating docosahexaenoic acid or ester thereof from marine microalgae". Japón, *Patente*: WO9421766.
- 122.- **Hejazi, M.A.; Wijffels, R.H.; Holwerda, E.K. & Tramper, J.** (2003). "Process for continuous production and extraction of carotenoids from natural sources". Netherland, *Patente*: EP1361280, AU2003224521, US2005203321 WO03095397.
- 123.- **Bijl, H.L.; Wolf, J.H.; Schaap, A. & J.M.J, V.** (2004). "Preparation of microbial polyunsaturated fatty acid containing oil from pasteurised biomass". Germany, *Patente*: DE69735997D WO9737032.

- 124.- **Reglero, G.; Señorans, F.J.; Ibañez, E.; Santoyo, S.; Torres, C.; Jaime, L.; Soler, C.; Rodríguez García-Risco, M.; Marin, F.R.; Ruiz, A. & Frial, P.** (2006). "Oil mixture of natural bioactive ingredients for the preparation of an enriched food product". Spain, *Patente*: ES2254018 WO2006053917.
- 125.- **Murakami, N. & Ishikura, M.** (2007). "Green algal extract containing astaxanthin having high storage stability". Japón, *Patente*: EP1820499 US2007196383, JP20060044165.
- 126.- **Catchpole, O.J.; Grey, J.B.; Mackenzie, A.D. & Tallon, S.J.** (2007). "Extraction of highly unsaturated lipids with liquid dimethyl ether". New Zealand, *Patente*: WO2007136281.
- 127.- **Nizard, C.; Friguet, B.; Moreau, M.; Bulteau, A.-L. & Saunois, A.** (2007). "Use of phaeodactylum algae extract as cosmetic agent promoting the proteasome activity of skin cells and cosmetic composition comprising same". Francia, *Patente*: FR02/01129, US07220417 WO02/080876.
- 128.- **Kyle, D.J.** (2007). "Arachidonic acid and methods for the production and use thereof". (Martek Bioscience) EEUU, *Patente*: EP1801226
- 129.- **Geiringer, K.T. & Griffiths, H.D.** (2008). "Production of ultrapure EPA and polar lipids from largely heterotrophic culture". (Photonix Corp. Ltd.) Nueva Zelanda, *Patente*: NZ20060548339 WO2008004900.

II. Capítulo II.- Optimización de la extracción de
tocoferol de Spirulina mediante SFE

1.	Introducción	41
1.1.	Objetivos y plan de trabajo	43
2.	Materiales y métodos	44
2.1.	Muestras y reactivos.....	44
2.2.	Planta piloto de extracción supercrítica	44
2.3.	Metodología de extracción.....	46
2.4.	Análisis químico de tocoferoles.....	48
3.	Resultados y discusión.....	49
3.1.	Rendimiento de extracción.....	50
3.2.	Extracción de vitamina E	53
4.	Conclusiones	57
5.	Bibliografía	58

1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se muestran los resultados más relevantes correspondientes a la optimización de la extracción de tocoferoles procedentes de *Spirulina platensis* mediante extracción supercrítica.

Los tocoferoles son antioxidantes liposolubles sintetizados únicamente por organismos fotoautótrofos (¹Schultz, Heintze y col. 1991; ²Yerin, Kormanovskii y col. 1984). Su estructura general se puede ver en la Fig. II-1. Suelen estar presentes como constituyentes del material lipídico insaponificable junto con fosfolípidos, carotenoides, clorofilas y alcoholes triterpénicos.

El término Vitamina E incluye a todos los tocoferoles y tocotrienoles que muestran la misma actividad biológica que el isómero D del α -tocoferol (2R-4'R-8'R-5,7,8-trimetiltocol ó RRR- α -tocoferol), su único isómero de origen biosintético. Esta bioactividad se basa en sus propiedades antioxidantes que dificultan la peroxidación lipídica, contribuyendo así a la estabilización de estructuras de membrana y de otras sustancias bioactivas (³Belitz & Grosch 1997). Pero además, la vitamina E está implicada directamente en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas y en la modulación de la velocidad de agregación plaquetaria.

Las deficiencias de vitamina E están ligadas a enfermedades crónicas, no obstante los mecanismos de actuación de su carencia aún no están claros (³Belitz & Grosch 1997). Las dos principales hipótesis consisten bien en su actuación como antioxidante o, bien, sus efectos en la regulación de diversos procesos metabólicos (transcripción, inducción a apoptosis o interferencia en los sistemas de producción hormonal) (⁴Brigelius-Flohe, Kelly y col. 2002). Algún ejemplo de los efectos de la carencia de vitamina E son: malformaciones fetales (malformación del tubo neural, muerte fetal prematura), enfermedades cardiovasculares (angina de pecho, infarto de miocardio...), diversos tipos de cánceres, fibrosis quística, preeclampsia, anemia hemolítica o diversas retinopatías (⁴Brigelius-Flohe, Kelly y col. 2002). La principal desventaja que presenta la vitamina E, al igual que la mayoría de los antioxidantes, es que en función de la dosis ingerida/absorbida puede llegar a producir efectos prooxidantes.

Habitualmente el aporte de suplementos de vitamina E consiste en la ingesta de tocoferoles de síntesis. Trabajos recientemente publicados sugieren que las mezclas de tocoferoles y tocotrienoles obtenidas a partir de fuentes naturales poseen mayores efectos beneficiosos que la ingesta de Vitamina E de origen sintético (⁵National Institute for Health 2002). Es probable que este hecho se deba a la presencia de isómeros inactivos en las mezclas sintéticas que están ausentes en los extractos de origen natural (⁶Brigelius-Flohe & Traber 1999). En la Tabla I-1 se puede ver la actividad biológica de algunos tocoferoles.

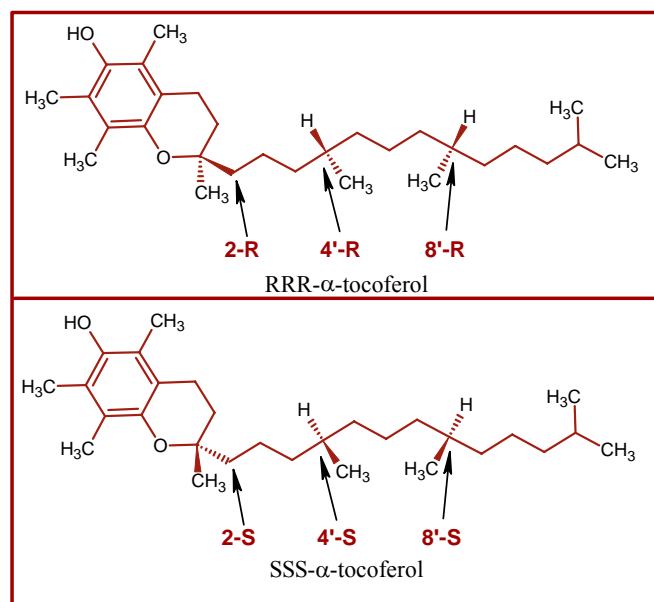


Fig. II-1.- Estructura de los dos principales estereoisómeros del α -tocoferol.

Las fuentes naturales más habituales para la obtención de tocoferoles son los gérmenes de cereales, los aceites vegetales, algunos aceites de pescado (bacalao), yema de huevo y el músculo de algunos pescados como la anguila. La microalga *Spirulina platensis*, objeto de este estudio, ha demostrado ser una fuente alternativa de tocoferoles. En trabajos previos se determinó el contenido de tocoferol en *Spirulina*, y encontraron valores comprendidos entre 0,011 y 0,014 mg α -tocoferol/g *Spirulina* seca (⁷Gómez-Coronado, Ibañez y col. 2004), lo que supone cantidades realmente bajas si se considera en su conjunto.

Tabla II-1.- Actividad biológica de los principales tocoferoles (³Belitz & Grosch 1997).

Tocoferol	Actividad (UI/mg)
Acetato de d,l- α -tocoferol*	1,0
d,l- α -tocoferol	1,1
Acetato de d - α -tocoferol	1,4
d- α -tocoferol (RRR)	1,5
l- α -tocoferol (SSS)	0,5
d,l- β -tocoferol	0,3
d,l- γ -tocoferol	0,15
d,l- δ -tocoferol	0,01
* El acetato de d,l- α -tocoferol sintético racémico es el preparado de vitamina E más empleado, por ello se ha escogido como sustancia patrón (1 mg=1 UI, Unidad Internacional)	

Una de las técnicas más importantes para el aislamiento de tocoferoles es la extracción con fluidos supercríticos. La SFE ha sido empleada, por ejemplo, para aislar y concentrar vitamina E a partir de diversas fuentes como aceite de palma (⁸Birtigh, Johannsen y col. 1995), germen de arroz, semillas de soja (⁹King, Favati y col. 1996), germen de trigo (¹⁰Ge, Ni y col. 2002; ¹¹Molsa 2000) y hoja

de olivo (¹²de Lucas, Martínez de la Ossa y col. 2002). En estos productos se han conseguido factores de enriquecimiento de hasta cuatro veces superiores a los alcanzados en las extracciones realizadas con disolventes orgánicos. Por ejemplo, Gast y col. (¹³Gast, Jungfer y col. 2005) estudiaron la purificación de tococromanoles a partir de aceite de palma y destilado de desodorizado de aceite de soja. Tras optimizar el proceso mediante medidas de equilibrio se alcanzaron incrementos de hasta diez veces en el caso del aceite de palma y de noventa y cuatro veces en el caso del desodorizado de soja. Lo que fue posible gracias al nuevo proceso de recirculado desarrollado por dichos autores.

1.1. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo del presente trabajo consistió en la optimación del proceso de extracción a escala piloto para concentrar vitamina E a partir de *Spirulina platensis*. Para ello, se eligieron diversos factores empleando una metodología de superficie de respuesta. Estos factores fueron: presión, temperatura y polaridad del disolvente de extracción. Gracias a la información obtenida, se pudieron precisar las condiciones óptimas del proceso a través de un modelado matemático capaz de predecir el comportamiento de la extracción en todo el intervalo de condiciones estudiado.

En la Fig. II-2 se puede ver el esquema de trabajo empleado en el presente capítulo para la optimación de la extracción de vitamina E a partir de *Spirulina*. Éste consistió en la selección de las condiciones de extracción mediante un diseño experimental. Posteriormente, se realizó la extracción supercrítica seguida de un fraccionamiento en cascada que permitió obtener dos fracciones (S1 y S2). Tras un análisis mediante HPLC de los tocoferoles, se realizó un examen estadístico de las concentraciones de vitamina E obtenidas, cuyo resultado es un modelo matemático del comportamiento de la extracción de tocoferoles a partir de *Spirulina*.

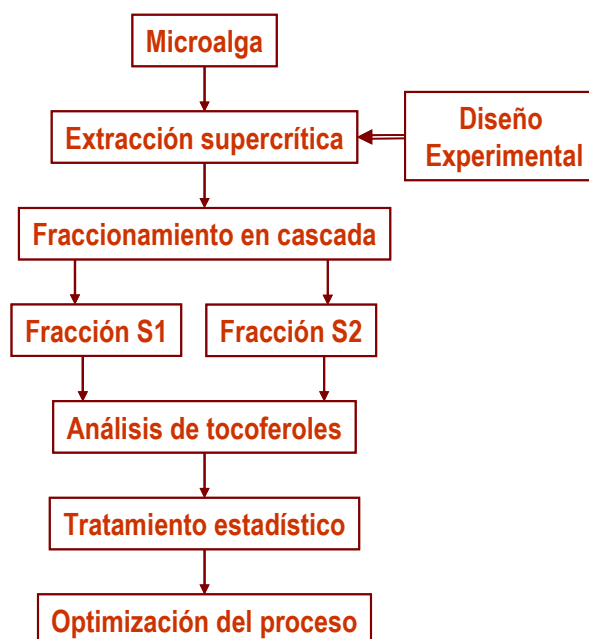


Fig. II-2.- Esquema de trabajo empleado para la optimación de la extracción

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

La microalga *Spirulina platensis*, desecada en corriente de aire caliente, fue proporcionada por Algamar (Pontevedra).

Los patrones de tocol y tocoferol fueron suministrados por Sigma (Darmstad, Alemania).

Los disolventes cromatográficos fueron suministrados por Labscan (Dublin) y el CO₂ (calidad N38) por AL Air liquide España (Madrid). El etanol empleado como modificador y la arena de mar lavada, grano fino, empleada en la extracción supercrítica fueron suministrados por Panreac (Barcelona).

2.2. Planta piloto de extracción supercrítica

Las extracciones se llevaron a cabo en la planta piloto de extracción supercrítica del grupo de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid. La planta piloto de extracción supercrítica de muestras sólidas fue construida en 1998 por el Grupo de Control de Procesos del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC en colaboración con Iberfluid S.A. Desde el momento de su construcción ha sufrido diversas modificaciones, como se puede apreciar en las fotografías de la Fig. II-3.

Actualmente la planta consta de:

- ✖ Dos bombas Dosapro-Milton Roy, una para CO₂ líquido con capacidad de 7,28 l/h, con una presión máxima de 460 bar y cabezal refrigerado y otra para la introducción de modificador a un caudal máximo de 1 l/h y 80 bar de presión máxima. Debido a que la mezcla CO₂—modificador se produce antes de la bomba de CO₂ no es necesario que la bomba de modificador alcance las presiones de trabajo, tan sólo la que exista en la botella de suministro de CO₂.
- ✖ Una celda de extracción de 270 ml de acero inoxidable 316 de 5 mm de espesor de pared equipada con un filtro en la parte inferior de 5 µm con el doble propósito de evitar que la muestra salga por el orificio de entrada del CO₂ y forzar la dispersión del mismo. Asimismo la celda de extracción cuenta con un fritado de 2 µm en la parte superior para evitar el arrastre de muestra y/o agentes dispersantes.
- ✖ Dos separadores de 250 ml de acero inoxidable 316 de 3 mm de espesor de pared, equipados con válvulas Hoke (mod. 2112L4Y) a la salida para la recogida de extracto y calefacción independiente. Y un tercer separador de 150 ml con capacidad para actuar como trampa criogénica. La presencia de estos separadores permite el fraccionamiento en cascada de los extractos mediante caídas consecutivas de densidad.

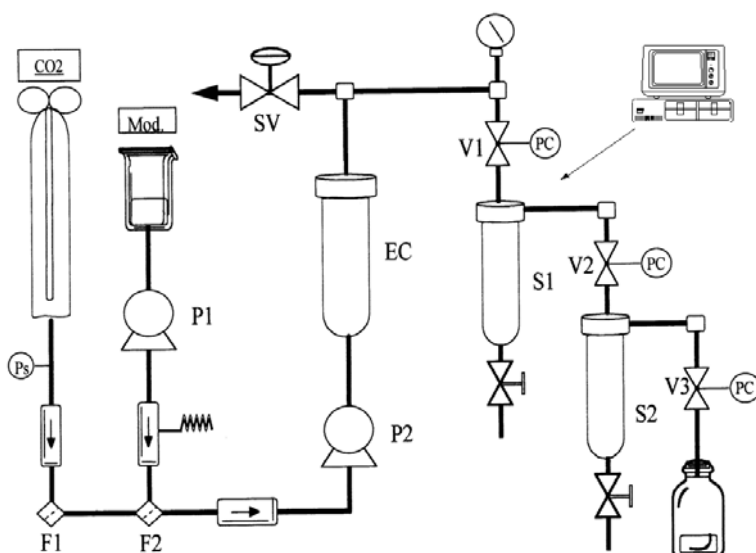
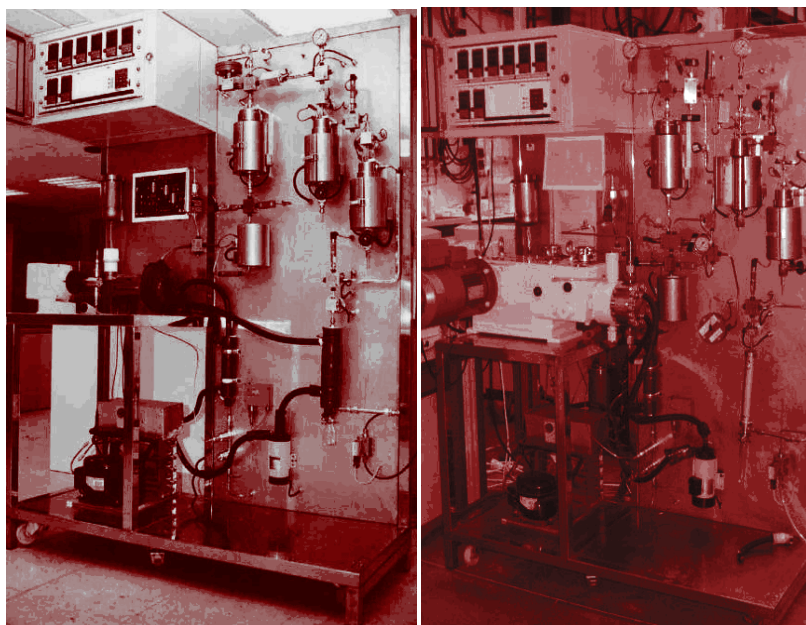


Fig. II-3.- Evolución de los componentes de la planta piloto de extracción con fluidos supercríticos con la que se ha realizado el presente trabajo (arriba; izquierda 1998, derecha 2006) y diagrama de flujo en el que se representa esquemáticamente el funcionamiento de dicha planta piloto.

- ✱ Válvulas de regulación micrométrica (Swagelok, SS-SS4-Bu) para controlar la presión de cada uno de los tramos de la planta. Dichas válvulas están actuadas mecánicamente por sendos servomotores Axor.
- ✱ Sistema de controladores PID (Toho Controllers) conectados de manera bidireccional con un ordenador equipado con software Adquir, diseñado por el Grupo de Control de Procesos del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC.
- ✱ Un circuito de limpieza diseñado por el Grupo de Tecnología de los Alimentos de la UAM.
- ✱ Elementos de seguridad tales como discos de ruptura LaMot y una válvula de seguridad actuada neumáticamente (Autoclave Engineers) tarados ambos a 400 bar.

La presente planta piloto ha sido empleada con anterioridad para la obtención de extractos con funcionalidad antioxidante a partir de plantas aromáticas (¹⁴Cavero 2003; ¹⁵Ibañez, Cifuentes *y col.* 2000; ¹⁶Ibañez, Oca *y col.* 1999; ¹⁷Señorans, Ibañez *y col.* 2000), pero hasta la fecha no había sido empleada para la obtención de extractos supercríticos a partir de microalgas.

2.3. Metodología de extracción

Todas las extracciones se llevaron a cabo en la planta anteriormente descrita empleando 75 g de microalga *Spirulina platensis* (Algamar, Pontevedra, España) mezclada con 120 g de arena de mar lavada de grano fino (250-300 μm , Merk, Darmstad, Alemania). El empleo de arena de mar evita la compactación de la muestra cuando ésta se encuentra sometida a elevadas presiones y con ello se evita la formación de canales preferentes para la circulación de CO_2 . Este hecho conllevaría una reducción de la superficie de contacto y, por tanto, de la velocidad de transferencia de materia.

Debido a la ausencia de datos de equilibrio de fases en mezclas multicomponente como son las matrices alimentarias, se optó por la vía del diseño experimental para la optimización del proceso de extracción. Concretamente, se decidió emplear un intervalo de presiones y temperaturas lo más amplio posible, teniendo siempre presentes dos aspectos fundamentales: las limitaciones experimentales de la planta piloto empleada y los datos bibliográficos referentes a compuestos de interés presentes en la microalga en cuestión hallados en la bibliografía (¹⁸Careri, Furlattini *y col.* 2001; ¹⁹Cocero & Ferrero 2002; ²⁰Cocero, González *y col.* 2000; ²¹Mendes, Nobre *y col.* 2003; ²²Mendes, Nobre *y col.* 1999; ²³Robles Medina, Molina Grima *y col.* 1998; ²⁴Sovová, Stateva *y col.* 2001; ²⁵Subra, Castellani *y col.* 1998).

Con todo ello, se realizó un Diseño Central Compuesto y Rotativo 2^2 con puntos de estrella ($\alpha=1,414$) y dos replicados en el centro con la ayuda de la aplicación informática Statgraphics Plus v.5.1 (Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., MD, USA, 2000). Los factores seleccionados para el diseño fueron la presión y la temperatura. Otras variables como el tiempo de extracción, la cantidad de muestra y la presencia de modificador se fijaron de antemano. La tabla de experimentos fruto del diseño realizado se muestra en la Tabla II-2. Como se puede ver, los intervalos de trabajo para presiones (78-361 bar) y temperaturas (26,7-83,3 $^{\circ}\text{C}$) permitieron abarcar densidades de entre 0,195 y 0,920 g/ml de CO_2 .

Otros parámetros que intervienen en la extracción y que se fijaron previamente en un mismo valor para todas las extracciones fueron:

- ✱ Tiempo de extracción: para calcular el tiempo óptimo de extracción se realizaron varias extracciones en las condiciones centrales del diseño y se fijó en la zona asintótica de la curva de rendimiento frente a tiempo.
- ✱ Caídas de presión: en el separador 1 se empleó un 50% de la presión de extracción correspondiente; en el separador 2 se empleó, a su vez, un 50% de la presión del separador 1 y en separador 3 presión atmosférica.

- * Temperaturas de los separadores: en todos los experimentos se empleó la misma temperatura que la de extracción.

Tabla II-2.- Matriz del diseño experimental (compuesto rotativo de segundo orden con puntos de estrella) empleado en el presente trabajo de extracción supercrítica de *Spirulina platensis*.

Exp.	Nivel Presión	Nivel Temp.	Presión real*	Temp. Real*	Densidad CO ₂ *
1	0	0	220	55	0,781
2	0	0	220	55	0,781
3	1	1	320	75	0,785
4	-1	1	120	75	0,318
5 [▽]	1,414	0	361	55	0,888
6 [▽]	0	-1,414	220	26,7	0,920
7 [▽]	-1,414	0	78	55	0,195
8 [▽]	0	1,414	220	83,3	0,618
9	-1	-1	120	35	0,768
10	1	-1	320	35	0,940

(*)Presiones reflejadas en bar, temperaturas en °C, densidades en g/ml.

(▽) Los experimentos 5, 6, 7, 8 son los denominados puntos de estrella

El diseño se realizó dos veces, una empleando CO₂ puro (a un caudal de 3 L/h de CO₂) y otra con CO₂+10% (v/v) de etanol como modificador. El empleo de modificadores permite conseguir no sólo un aumento de la polaridad del fluido extractante, sino también un cambio en la viscosidad del mismo y, en algunos casos, la formación de una segunda fase (²⁶Joung, Yoo y col. 2001). En este caso, como se puede apreciar en la Fig. I-3 se obtendría una fase líquida (etanol-CO₂) lo que permitiría simultanear extracción supercrítica y líquida, pero con reducidos volúmenes de disolvente. En nuestro caso, la adición de modificador a la corriente de CO₂ se realizó una vez alcanzadas las condiciones de presión y temperatura en la celda de extracción y, únicamente, durante un 75% del tiempo total de extracción con el fin de evitar restos etanólicos en el residuo de extracción.

Las variables respuesta del diseño experimental propuesto fueron la concentración de vitamina E en los extractos y el rendimiento de extracción obtenido. Se propuso el siguiente modelo polinomial cuadrático para las variables respuesta (Y_i):

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \times P + \beta_2 \times T + \beta_{1,1} \times P^2 + \beta_{2,2} \times T^2 + \beta_{1,2} \times P \times T + \epsilon \quad (\text{Ecuación II.1})$$

Donde β_0 es el término independiente; β_1 y β_2 son los coeficientes lineales; β_{11} y β_{22} los coeficientes cuadráticos; β_{12} el coeficiente de la interacción; y ϵ es el error experimental. Los parametros del modelo fueron estimados empleando regresión lineal múltiple (MLR) mediante el software Statgraphics Plus 5.1, el mismo software con el que se realizó el diseño experimental.

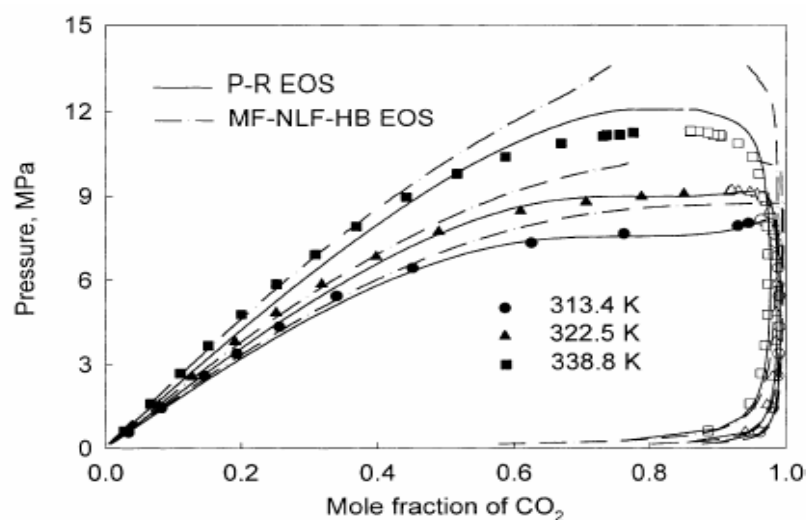


Fig. II-4.- Comparación de los datos medidos por (26)Joung, Yoo y col. 2001 frente a los datos predichos por dos ecuaciones de estado, Peng-Robinson (PR-EoS) y Multi-Fluid Nonrandom Lattice Fluid Hydrogen-Bonding (MF-NLF-HB-EoS) para el equilibrio CO₂-etanol a diferentes temperaturas.

El efecto de cada término en el modelo y su significación estadística, se analizaron mediante un gráfico de Pareto estandarizado. Los términos que resultaron ser significativamente iguales a cero ($P > 0,10$), fueron excluidos del modelo matemático y éste se reajustó mediante MLR. El ajuste del modelo fue evaluado mediante el coeficiente de regresión (R^2) y la desviación estándar de los residuos (RSD). Con ello se pudo obtener la superficie de respuesta, así como las condiciones experimentales que maximizaban la variable respuesta: rendimiento o concentración de vitamina E.

2.4. Análisis químico de tocoferoles

El método de análisis empleado para cuantificar los tocoferoles en extractos supercríticos de Spirulina está basado un método previamente desarrollado y validado por Gómez-Coronado y Barbas (27Gómez-Coronado & Barbas 2003).

Se prepararon disoluciones etanólicas de α - y γ -tocoferol (9 mg/ml) para emplearlas como patrones externos y de tocol (2 mg/ml) como patrón interno. Todas ellas se mantuvieron en congelación y protegidas de la luz. En el momento del análisis el contenido exacto en α - y γ -tocoferol fue determinado mediante medida espectrofotométrica a 295 nm para el α -tocoferol ($\epsilon = 3058 \text{ l/mol} \times \text{cm}$) y a 298 nm para el γ -tocoferol ($\epsilon = 3810 \text{ l/mol} \times \text{cm}$). Finalmente el patrón de trabajo consistió en una mezcla de tocol, α - y γ -tocoferol rediluida en acetona. El resto del tratamiento recibido por dicho patrón fue el mismo que el de los extractos, es decir, se pesaron 250 mg de extracto en un tubo de vidrio junto a 200 μl de tocol como patrón interno (0,13 mg/ml) y 3,8 ml de acetona, se trataron durante un minuto en un baño de ultrasonidos, las muestras se centrifugaron y filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45 μm . El permeado fue recogido sobre viales de HPLC.

El sistema de cromatografía líquida consistió en un cromatógrafo Beckman (Fullerton, CA, U.S.A.) equipado con inyector automático y detector de haz de diodos, además, se conectó al equipo un detector de fluorescencia de Waters (Milford, EE.UU.) y un horno para columnas Bio-Rad (Hercules, EE.UU.). Los análisis se realizaron empleando una columna Discovery[®] C18, 5 μm (25 x

0.46 cm, Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A.) y un cartucho guardacolumna C18 para evitar que los compuestos menos polares llegasen a la columna.

Las fases móviles empleadas fueron: agua Mili-Q (Milli-Q system, Millipore, Billerica, EE.UU.) como fase A y acetonitrilo-metanol (70:30, v/v) con un 0,1% (v/v) de ácido acético como fase B. La composición inicial de fases consistió en una mezcla 15:85 (A:B), y varió mediante un gradiente lineal hasta un 100% de B en 24 minutos. Durante todo el gradiente se empleó un caudal de 2 ml/min, pero al llegar al minuto 24 el caudal se aumentó a 3 ml/min en un minuto para terminar de eluir el resto de compuestos más apolares. En el minuto 35 el sistema volvió a las condiciones iniciales de composición de fases. Para la detección del α -tocoferol se eligió 295 nm como longitud de onda, mientras que para el resto de los tocoferoles se utilizó el detector de fluorescencia empleando 295 nm (excitación) y 350 nm (emisión).

La identificación de los picos se realizó por comparación de los tiempos de retención con los correspondientes a patrones puros y fueron confirmados mediante los espectros UV-Vis obtenidos con el detector de haz de diodos, que a su vez permitió la confirmación de la pureza de los picos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, los valores experimentales correspondientes a las condiciones de extracción supercrítica (Tabla II-2) se seleccionaron teniendo en cuenta tanto las limitaciones experimentales de la planta piloto empleada como los datos publicados anteriormente para la extracción de compuestos de interés alimentario a partir de microalgas (¹⁸Careri, Furlattini *y col.* 2001; ¹⁹Cocero & Ferrero 2002; ²⁰Cocero, González *y col.* 2000; ²¹Mendes, Nobre *y col.* 2003; ²²Mendes, Nobre *y col.* 1999; ²³Robles Medina, Molina Grima *y col.* 1998; ²⁴Sovová, Stateva *y col.* 2001; ²⁵Subra, Castellani *y col.* 1998).

Para fijar el tiempo de extracción, se realizaron previamente una serie de extracciones secuenciales en las condiciones del punto central del diseño (220 bar, 55°C). El tiempo total se fijó en el inicio de la parte asintótica de la curva Rendimiento-tiempo, como se puede ver en la Fig. II-5, este fue de 75 minutos.

Los extractos obtenidos en las condiciones que se muestran en la Tabla II-2 se fraccionaron en cascada entre los tres separadores de que constaba la planta. En el primer separador se empleó la misma temperatura y una caída de presión del 50% respecto a la presión de extracción. En el segundo separador también se empleó la misma temperatura que la de extracción pero una caída de presión del 50% respecto a la del separador 1 (sin superar el máximo de 60 bar impuesto por las limitaciones de la planta piloto). En el tercer separador se produjo la completa despresurización al encontrarse la corriente de CO₂ en condiciones de presión atmosférica en este separador. Sin embargo, la temperatura fue regulada por el enfriamiento asociado al efecto Joule-Thomson⁸ (*la expansión adiabática de un fluido conlleva un descenso de temperatura*). Este efecto fue aprovechado a modo de trampa fría, sin necesidad de aportar frío desde el exterior, para atrapar los compuestos más

⁸ Descrito en 1852 por James Prescott Joule y William Thomson (Lord Kelvin). Este descenso de temperatura produce de manera ordinaria en la mayoría de los gases reales salvo raras excepciones como el hidrógeno y el helio.

solubles en CO₂ gaseoso y otros compuestos arrastrados por el paso en continuo de una corriente de gas. Por lo tanto, de cada extracción se obtuvieron tres fracciones representadas como S1, S2 y S3.

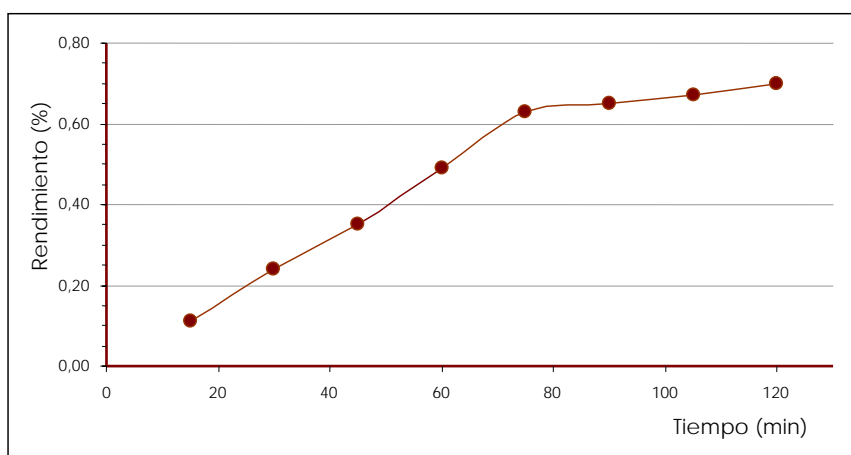


Fig. II-5.- Evolución del rendimiento frente al tiempo de extracción, condiciones de extracción: 220 bar y 55°C, CO₂ puro.

3.1. Rendimiento de extracción

Los rendimientos obtenidos, tras secar las muestras en rotavapor o bajo corriente de nitrógeno (dependiendo del volumen de etanol a eliminar), en las tres fracciones de cada extracción con y sin modificador se muestran en las Tabla II-3 y Tabla II-4.

Tabla II-3.- Distribución de pesos y rendimientos obtenidos en las extracciones realizadas empleando un 10% de etanol como modificador

Exp.	Bar	°C	Separador	Peso (g)	Peso total extraído	Rendimiento total de extracción	Distribución peso (%)
1	220	55	S1	0,218	2,5518	3,40%	8,54
			S2	1,845			72,30
			S3	0,4888			19,16
2	220	55	S1	0,474	1,7441	2,32%	27,18
			S2	1,267			72,64
			S3	0,0031			0,18
3	320	75	S1	0,661	3,159	4,21%	20,92
			S2	2,498			79,08
			S3	0			0,00
4	120	75	S1	3,318	3,4169	4,55%	97,11
			S2	0,083			2,43
			S3	0,0159			0,47
5	361	55	S1	0,63	3,8322	5,10%	16,44
			S2	2,958			77,19
			S3	0,2442			6,37
6	220	26,7	S1	0,648	2,3243	3,09%	27,88
			S2	1,625			69,91
			S3	0,0513			2,21
7	78	55	S1	5,957	6,0616	8,08%	98,27

8	220	83,3	S2	0,1046	1,145	1,52%	1,73
			S3	0			0,00
			S1	0,843			73,62
9	120	35	S2	0,261	3,122	4,16%	22,79
			S3	0,041			3,58
			S1	1,247			39,94
10	320	35	S2	1,837	1,977	2,63%	58,84
			S3	0,038			1,22
			S1	0,0176			0,89
			S2	1,946			98,43
			S3	0,0134			0,68

Tabla II-4.- Distribución de pesos y rendimientos obtenidos en las extracciones realizadas empleando únicamente CO₂.

Exp.	Bar	°C	Separador	Peso (g)	Peso total extraído	Rendimiento total de extracción	Distribución peso (%)
11	220	55	S1	0,0345	0,1944	0,25%	17,75
			S2	0,1162			59,77
			S3	0,0437			22,48
12	220	55	S1	0,0243	0,4404	0,58%	5,52
			S2	0,3872			87,92
			S3	0,0289			6,56
13	320	75	S1	0,0204	0,6413	0,85%	3,18
			S2	0,5231			81,57
			S3	0,0978			15,25
14	120	75	S1	0,3677	0,4703	0,62%	78,18
			S2	0,0726			15,44
			S3	0,0300			6,38
15	361	55	S1	0,0185	0,4543	0,60%	4,07
			S2	0,3954			87,03
			S3	0,0404			8,89
16	220	26,7	S1	0,0084	0,2965	0,39%	2,83
			S2	0,1424			48,03
			S3	0,1457			49,14
17	78	55	S1	0,2390	0,3244	0,43%	73,67
			S2	0,0854			26,33
			S3	0			0,00
18	220	83,3	S1	0,1870	0,4661	0,62%	40,12
			S2	0,1047			22,46
			S3	0,1744			37,42
19	120	35	S1	0,0475	0,4963	0,66%	9,57
			S2	0,4444			89,54
			S3	0,0044			0,89
20	320	35	S1	0,0190	0,4883	0,65%	3,89
			S2	0,2409			49,33
			S3	0,2284			46,77

De estas tablas se puede concluir que los rendimientos de extracción son mayores para el caso de las extracciones realizadas con etanol (Tabla II-3), aproximadamente en un orden de magnitud.

De entre las condiciones ensayadas, los mejores rendimientos (8,1%) se obtuvieron trabajando a 78 bar y 55 °C y utilizando CO₂ con 10% de etanol. En estas condiciones no se produce una mezcla completa entre el CO₂ y el etanol, de hecho, la práctica totalidad del etanol se encuentra líquido, como se puede observar en la Fig. I-3, donde se aprecia más de un 95% de CO₂ en la fase gaseosa.

Dicha fase gaseosa coexiste con otra líquida formada por un 35% de CO₂. Al contener la mezcla tan solo un 10% etanol, la relación líquido:gas es aproximadamente de 1:6 (p/p), por lo tanto el fluido extractante debería ser algo similar a un spray. Las gotas de dicho spray impregnan la matriz de Spirulina y se producen dos tipos de extracción: una estática debida a las gotas de la fase líquida y otra dinámica producida por el arrastre continuo de la fase gaseosa.

En el caso de las extracciones en las que únicamente se empleó CO₂, se obtuvo un mayor rendimiento en la realizada a mayor presión y temperatura (320 bar y 75°C).

Con los datos de rendimiento, se realizó un análisis de superficie de respuesta obteniéndose un modelo matemático, en función de la presión y la temperatura, capaz de predecir los rendimientos obtenidos en los separadores.

Superficie de respuesta para extracciones con CO₂ y etanol

En la Fig. II-6 se puede ver la superficie de respuesta elaborada a partir de los datos de rendimiento en el separador 1 empleando CO₂ y etanol. En este caso los únicos factores cuyo efecto era significativamente distinto de cero para un nivel de confianza superior al 95% ($P > 0,05$ en el test de ANOVA) fueron la presión y su efecto cuadrático, lo que queda representado en el diagrama de Pareto por los valores cuyo efecto estandarizado son superiores a 2,8, en este caso.

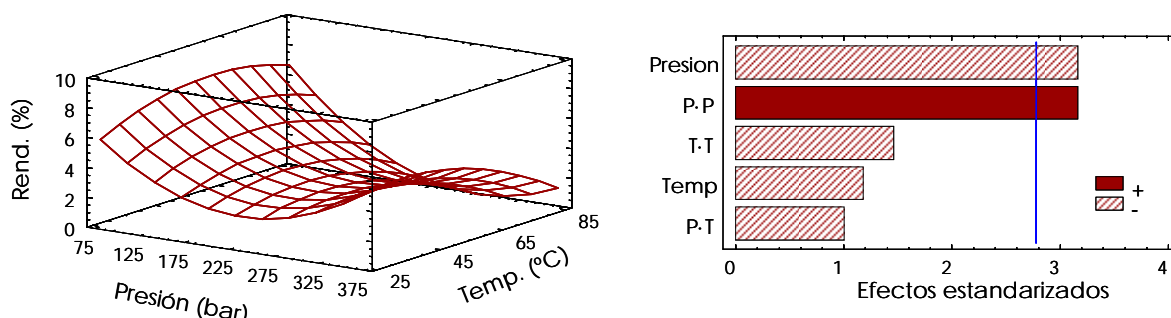


Fig. II-6.- Superficie de respuesta y diagrama de Pareto obtenido para el rendimiento en el separador 1 empleando CO₂ y etanol ($R^2=0,8882$). La línea vertical indica el punto de significación estadística ($P > 0,05$)

Superficie de respuesta para extracciones con CO₂

Al igual que para las extracciones de CO₂+etanol, se elaboró un gráfico de superficie de respuesta con los rendimientos obtenidos en el separador 1 (Fig. II-7). Pero como muestra el gráfico

de Pareto en esta ocasión los factores estadísticamente significativos ($P > 0,05$) con influencia en el resultado obtenido fueron la presión, la temperatura y su interacción.

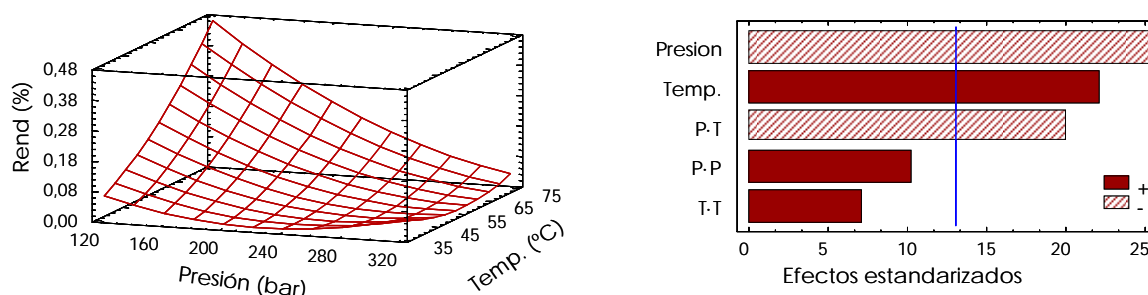


Fig. II-7.- Superficie de respuesta y diagrama de Pareto obtenido para el rendimiento en el separador 1 empleando únicamente CO_2 ($R^2=0,9706$). La línea vertical indica el punto de significación estadística ($P > 0,05$)

En ninguno de los casos se puede afirmar con seguridad que se ha obtenido un buen modelado matemático, puesto que la desviación residual obtenida es demasiado elevada. No obstante, los coeficientes de correlación obtenidos para las ecuaciones que gobiernan las superficies de respuesta presentadas ($R^2_{\text{CO}_2+\text{etanol}}=0,8882$ y $R^2_{\text{CO}_2}=0,9706$) frente a los datos experimentales señalan que existen buenas correlaciones entre ambos parámetros.

A la vista de los resultados para ambos casos se puede concluir que tan sólo sería notable el aumento de la temperatura para las extracciones realizadas sin etanol, es más, en este caso puede apreciarse un efecto conjunto de las variables presión y temperatura, aunque muy suave. En el caso de las extracciones realizadas con CO_2 y etanol la única variable de las estudiadas (P y T) que ejerce efectos significativos es la presión.

En cualquier caso se puede observar que el mayor rendimiento en el primer separador se obtendría trabajando a presiones bajas y temperaturas elevadas.

Por otro lado, aunque se intentó llevar a cabo el ajuste matemático de los datos correspondientes a los separadores 2 y 3, únicamente el separador 1 presentó buenos coeficientes de regresión para poder explicar el rendimiento de extracción en función de la presión y la temperatura.

3.2. Extracción de vitamina E

En la Tabla II-5 se presentan los resultados obtenidos para la determinación de vitamina E en los extractos de Spirulina. Los datos de concentración corresponden a la cuantificación de los separadores 1 y 2.

Se aplicó MLR para estimar los parámetros del modelo propuesto en la Ecuación 1 para la variable respuesta (contenido en vitamina E en el separador 1 de los extractos obtenidos con CO_2 puro y $\text{CO}_2+\text{etanol}$). En la Fig. II-8 los diagramas de Pareto muestran, para cada una de las dos respuestas, la significación estadística de los diferentes términos en el modelo. Los efectos (computados como el doble de los coeficientes MLR para los factores centrados y escalados) están ordenados de manera descendente en valor absoluto. En dichos gráficos, se puede apreciar que los términos que, siendo significativamente distintos de cero ($P < 0,10$), poseen una mayor influencia en

la variable respuesta (empleando CO₂) son la temperatura de extracción (T) y su término cuadrático (T×T). Como se ve en la Fig. II-8, ambos producen un efecto positivo. En el caso de las extracciones realizadas empleando CO₂+etanol, únicamente el término cuadrático de la temperatura (T×T), resulta ser significativamente distinto de cero (P<0,10).

Tabla II-5.- Contenido de vitamina E (mg/g extracto) de los diversos extractos obtenidos en el separador 1 en las condiciones experimentales del diseño.

Exp.	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Vitamina E (mg/g de extracto)	
1	55	220	2,70	CO ₂ + Etanol
2	55	220	1,79	
3	83,3	220	5,43	
4	55	361,4	0,88	
5	75	120	1,70	
6	26,7	220	2,41	
7	75	320	3,13	
8	35	320	2,02	
9	55	78,6	0,49	
10	35	120	2,84	
11	55	220	3,15	CO ₂ puro
12	55	220	3,25	
13	83,3	220	31,61	
14	55	361,4	5,15	
15	75	120	11,15	
16	26,7	220	6,02	
17	75	320	16,06	
18	35	320	3,8	
19	55	78,6	1,1	
20	35	120	3,05	

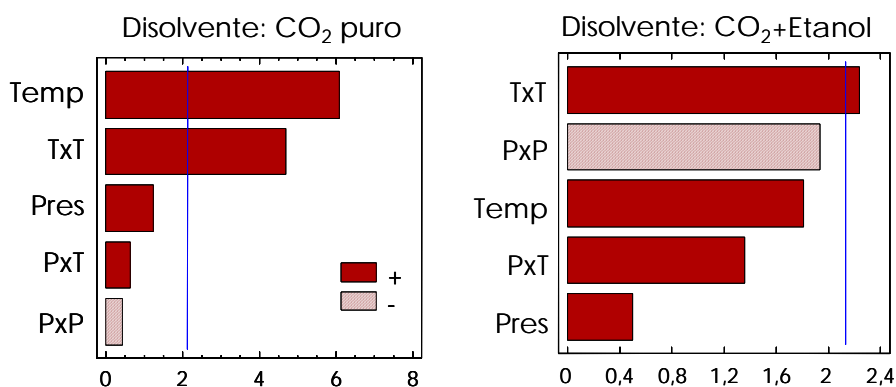


Fig. II-8.- Diagramas de Pareto obtenidos para el el contenido en vitamina E de los diferentes extractos. La línea vertical indica el punto de significación estadística (P>0,10)

Los resultados obtenidos concuerdan con diversos estudios realizados previamente por otros autores para la extracción de vitamina E a partir de múltiples matrices, como por ejemplo, semillas de sésamo negro (²⁸Hu, Xu y col. 2004). En este caso, los autores emplearon un diseño 3³ considerando como factores del mismo, la temperatura, la presión de extracción y el caudal de CO₂. En dicho estudio la temperatura resultó ser el factor que presentó una mayor influencia en la recuperación de vitamina E, mientras que el caudal de CO₂ no presentó una influencia significativa (en las condiciones experimentales empleadas). Estos resultados coinciden con la aseveración de que los tocoferoles son compuestos fácilmente extraíbles (⁹King, Favati y col. 1996). Dado que la temperatura

afecta positivamente a la extracción de vitamina E, es razonable pensar que dicha obtención estará favorecida a elevadas temperaturas. En la bibliografía se pueden encontrar diversas referencias en las que se emplean temperaturas de 80 y 90 °C para la extracción de vitamina E a partir de copos de soja (⁹King, Favati *y col.* 1996) y hojas de palma (⁸Birtigh, Johannsen *y col.* 1995), respectivamente. En un trabajo realizado por Skerget *y col.* (²⁹Skerget, Kotnik *y col.* 2003) se proporcionan datos de equilibrio para el sistema binario α -tocoferol—CO₂ a diferentes presiones y temperaturas, hasta 80 °C. Los resultados muestran que la solubilidad del α -tocoferol en la “fase ligera” aumenta con la presión y la temperatura hasta ser máxima a 80 °C.

A partir de la significación estadística de los coeficientes de regresión estimados, los términos del modelo que resultaron no ser significativamente distintos de cero ($P > 0,10$) se excluyeron de la Ecuación II.1 y el modelo matemático fue reajustado mediante MLR.

Tabla II-6.- Coeficientes de regresión, para los factores sin escalar, y valores estadísticos de su ajuste, obtenidos mediante MLR.

Concentración de vitamina E (mg/g extracto)		
Términos del modelo	Disolvente: CO ₂	Disolvente: CO ₂ +Etanol
Constante	36,358	3,393
P	0,0142	0,034
T	-1,700‡	-0,212
P×P		-0,0001
T×T	0,0187‡	0,0022‡
P×T		
Valores estadísticos para el ajuste del modelo		
R ²	0,94	0,76
RSD	2,87	0,90

R²: coeficiente de ajuste; RSD: desviación estándar de los residuos; ‡ coeficiente de regresión significativamente distinto de cero ($P < 0,01$).

A partir de los resultados expresados en la Tabla II-6, se pueden obtener las siguientes conclusiones: el modelo encontrado fue suficientemente adecuado para describir los datos únicamente cuando se empleaba CO₂ puro como agente de extracción. En este caso particular, la fracción de la variación de la variable respuesta explicada por el modelo (R^2) fue superior al 94%. Considerando CO₂+Etanol, no se pudo encontrar un verdadero modelo, ya que se obtuvo un R^2 del 76%. Por tanto, no se realizó ningún estudio estadístico ulterior para este disolvente.

La Fig. II-9 muestra la superficie de respuesta, empleando CO₂, en función de la presión y la temperatura. Analizando el gráfico, se puede ver que el máximo de extracción de tocoferol se encuentra trabajando a altas temperaturas y presiones, a pesar de que la presión no produce un efecto estadísticamente significativo en el resultado obtenido. Por tanto, como es de esperar a la vista de la gráfica, las condiciones óptimas del proceso de extracción, proporcionadas por el programa estadístico, fueron iguales a la presión y temperatura máximas empleadas, esto es, 83 °C y 361 bar. El valor predicho para la concentración de vitamina E (mg/g extracto) en el óptimo fue de 29,4 mg/g extracto. Suponiendo en esas condiciones un rendimiento de extracción de 0,53 % (promedio del rendimiento obtenido en los puntos experimentales más cercanos, en el separador 1), la concentración de vitamina E por gramo de extracto de *Spirulina* sería igual a 0,155 mg α -tocoferol/g,

lo que significaría un enriquecimiento de doce veces comparado con el valor inicial de concentración en Spirulina (0,011-0,014 mg α -tocoferol/g microalga seca (⁷Gómez-Coronado, Ibañez y col. 2004).

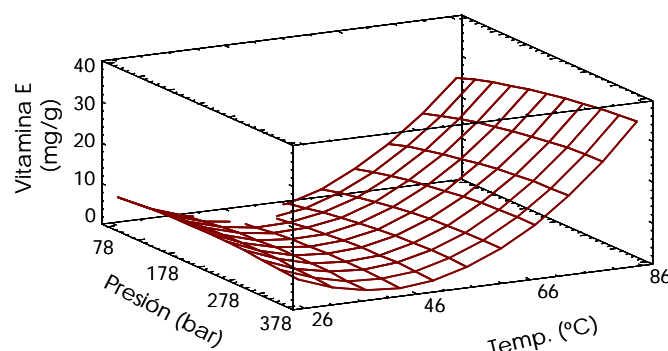


Fig. II-9.- Superficie de respuesta obtenida para la concentración de vitamina E (mg/g extracto) empleando únicamente CO₂.

Los datos obtenidos en este trabajo están de acuerdo con estudios similares realizados con otras materias primas. No obstante, parece claro que la composición química del material a tratar determinará las condiciones óptimas de extracción para un compuesto específico como el tocoferol. Por ejemplo, ha sido ampliamente descrito (¹²de Lucas, Martínez de la Ossa y col. 2002; ²⁹Skerget, Kotnik y col. 2003) que el enriquecimiento de tocoferol está relacionado con la capacidad de extracción de otros compuestos presentes en la matriz, con ciertos efectos competitivos de extracción o bien con efectos de dilución, que pueden ocurrir especialmente a elevadas presiones. Esta afirmación resulta cierta cuando los tocoferoles se encuentran junto a otros compuestos de naturaleza oleosa, como los ácidos grasos (libres o esterificados), pigmentos o glicolípidos, los cuales son más solubles a elevadas presiones y temperaturas medias. En este caso particular, un aumento en la presión de extracción conlleva una dilución del producto obtenido y, por tanto, una menor concentración de los tocoferoles.

Como conclusión al presente trabajo se sugieren temperatura y presión máximas por ser óptimas para el proceso de enriquecimiento de vitamina E, ya que en esas condiciones se produce un significativo descenso de la densidad de extracción y por tanto una menor extracción de pigmentos y otro material liposoluble. Dado que la presión de extracción no es el factor más importante en la extracción de vitamina E, el modelo matemático fue empleado para predecir la concentración de la misma cuando la presión decrecía a partir de la óptima (361 bar) a valores menores manteniendo la temperatura en el valor óptimo, 83,3 °C. Esto es, considerando una presión de 320 bar, la concentración de tocoferol baja a 28,8 mg/g extracto, mientras que a 220 bar la concentración predicha es de 27,4 mg/g extracto y a 120 bar, 25,9 mg α -tocoferol/g extracto. Considerando la RSD proporcionada por el modelo, no se observó ninguna diferencia significativa entre la concentración de vitamina E en el óptimo y a 320 bar y, a su vez, entre esta y la obtenida a 220 bar. Obviamente desde el punto de vista económico, trabajar a elevadas presiones supone un aumento sustancial los de costes de inversión en equipamiento y en procesado. Por tanto, trabajando a 220 bar y 83,3 °C se conseguirían enriquecimientos en la concentración de vitamina E de incluso ocho veces.

4. CONCLUSIONES

- ✖ En el presente trabajo se ha optimizado un proceso de extracción con fluidos supercríticos (SFE) en planta piloto para la obtención de fracciones altamente enriquecidas en vitamina E a partir de la microalga *Spirulina platensis*.
- ✖ Por medio de un diseño central compuesto y rotativo, fue posible estudiar y estimar la concentración de vitamina E y el rendimiento de extracción en función de las temperaturas y presiones de extracción. Los mejores rendimientos de extracción se consiguieron en condiciones de presión bajas (78 bar) y temperaturas intermedias (55 °C) empleando como agente extractante CO₂ con un 10% de etanol como modificador.
- ✖ Cuando se empleó CO₂ puro como agente de extracción, se obtuvieron la condiciones óptimas de extracción de vitamina E a 361 bar y 83,3 °C. En el óptimo, el valor predicho fue de 29,4 mg/g extracto, lo que implica un enriquecimiento de tocoferol de más de 12 veces la concentración inicial presente en la materia prima.
- ✖ Los resultados presentados en el este capítulo muestran, por primera vez, las posibilidades de la SFE como tecnología limpia para la producción de concentrados de tocoferol a partir de microalgas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Schultz, G., Heintze, A. y col. (1991). Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism. 6th Annual Penn State Symposium in Plant Physiology, University Park, Pennsylvania, American Society of Plant Physiologists.
- 2.- Yerin, A.N., Kormanovskii, A.Y. y col. (1984). "Localization of α -tocopherol in chloroplasts". Biophysics 29(2): 363-364.
- 3.- Belitz, H.D. & Grosch, W. (1997). Química de los alimentos. Zaragoza, Editorial Acribia.
- 4.- Brigelius-Flohe, R., Kelly, F.J. y col. (2002). "The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research". The American Journal Of Clinical Nutrition 76(4): 703-716.
- 5.- National Institute for Health, N.H.I. (2002). National Institute for Health. Facts about Dietary Supplements-Vitamin E. Maryland, Warren Grant Magnuson Clinical Center.
- 6.- Brigelius-Flohe, R. & Traber, M.G. (1999). "Vitamin E: function and metabolism". The FASEB Journal: Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology 13(10): 1145-1155.
- 7.- Gómez-Coronado, D.J.M., Ibañez, E. y col. (2004). "Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin". Journal of Chromatography A 1054(1-2): 227-233.
- 8.- Birtigh, A., Johannsen, M. y col. (1995). "Supercritical-fluid extraction of oil-palm components". The Journal of Supercritical Fluids 8(1): 46-50.
- 9.- King, J.W., Favati, F. y col. (1996). "Production of tocopherol concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography". Separation Science and Technology 31(13): 1843-1857.
- 10.- Ge, Y., Ni, Y. y col. (2002). " Optimization of the Supercritical Fluid Extraction of Natural Vitamin E from Wheat Germ Using Response Surface Methodology". Journal of Food Science 67(1): 239-243.
- 11.- Molsa, A. (2000). "Quality of Wheat Germ Oil Extracted by Liquid and Supercritical Carbon Dioxide". Journal of the American Oil Chemists' Society 77: 969-974.
- 12.- de Lucas, A., Martinez de la Ossa, E. y col. (2002). "Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves". The Journal of Supercritical Fluids 22(3): 221-228.
- 13.- Gast, K., Jungfer, M. y col. (2005). "Purification of tocopherols from edible oil". The Journal of Supercritical Fluids 34(1): 17-25.
- 14.- Cavero, S. (2003). Obtención de extractos de plantas aromáticas mediante fluidos subcríticos y supercríticos: caracterización química y funcional. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid: 254.
- 15.- Ibañez, E., Cifuentes, A. y col. (2000). "Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)". Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 4060-4065.
- 16.- Ibañez, E., Oca, A. y col. (1999). "Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants". Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 1400-1404.
- 17.- Señorans, F.J., Ibañez, E. y col. (2000). "Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants". Journal of Chromatography A 870(1-2): 491-499.
- 18.- Careri, M., Furlattini, L. y col. (2001). "Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina* Pacifica algae: a chemometric approach". Journal of Chromatography A 912(1): 61-71.
- 19.- Cocero, M.J. & Ferrero, S. (2002). "Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch. Effect of operating conditions". The Journal of supercritical fluids 22: 237-245.
- 20.- Cocero, M.J., González, S. y col. (2000). "Supercritical extraction of unsaturated products. Degradation of β -carotene in supercritical extraction processes". The Journal of Supercritical Fluids 19: 39-44.
- 21.- Mendes, R.L., Nobre, B.P. y col. (2003). "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae". Inorganica Chimica Acta 356: 328-334.
- 22.- Mendes, R.L., Nobre, B.P. y col. (1999). "Solubility of β -carotene in supercritical carbon dioxide and ethane". The Journal of Supercritical Fluids 16: 99-106.
- 23.- Robles Medina, A., Molina Grima, E. y col. (1998). "Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids". Biotechnology Advances 16(3): 517-580.

- 24.- **Sovová, H., Stateva, R.P. y col.** (2001). "Solubility of β -carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers". The Journal of Supercritical Fluids 21(3): 195-203.
- 25.- **Subra, P., Castellani, S. y col.** (1998). "Extraction of b-carotene with supercritical fluids. Experiments and modelling". The Journal of Supercritical Fluids 12: 261-269.
- 26.- **Joung, S.N., Yoo, C.W. y col.** (2001). "Measurements and correlation of high-pressure VLE of binary CO₂-alcohol systems (methanol, ethanol, 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol)". Journal of Fluid Phase Equilibria 185: 219-230.
- 27.- **Gómez-Coronado, D.J.M. & Barbas, C.** (2003). "Optimised and validated HPLC method for α - and γ -tocopherol measurement in *Laurus nobilis* leaves. New data on tocopherol content". Journal of agricultural and Food Chemistry 51: 5196-5201.
- 28.- **Hu, Q., Xu, J. y col.** (2004). "Antioxidant Activity of Extracts of Black Sesame Seed (*Sesamum indicum* L.) by Supercritical Carbon Dioxide Extraction". Journal of agricultural and Food Chemistry 52(4): 943-947.
- 29.- **Skerget, M., Kotnik, P. y col.** (2003). "Phase equilibria in systems containing [alpha]-tocopherol and dense gas". The Journal of Supercritical Fluids 26(3): 181-191.

III. Capítulo III: Caracterización química y
funcional de extractos supercríticos de *Spirulina*
platensis

1. Introducción	63
1.1. Objetivos y plan de trabajo	64
2. Materiales y métodos	65
2.1. Muestras y reactivos	65
2.2. Extracción supercrítica	65
2.3. Determinación de la actividad funcional	65
2.3.1. Actividad antioxidante	65
2.3.1.1. Captación de radicales DPPH	65
2.3.1.2. Método de autooxidación del ácido linoleico	66
2.3.2. Medida de la actividad antimicrobiana	67
2.3.2.1. Cepas utilizadas	67
2.3.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas.	67
2.4. Caracterización química de los extractos	68
2.4.1. Cromatografía en capa fina (TLC)	68
2.4.2. Análisis de pigmentos mediante HPLC-DAD	69
2.4.3. Análisis de los extractos mediante HPLC-MS	69
2.4.4. Cuantificación de ácidos grasos	70
3. Resultados y discusión	71
3.1. Actividad antimicrobiana	71
3.2. Actividad antioxidante	74
3.2.1. Captación de radicales DPPH	74
3.2.2. Autooxidación del ácido linoleico	75
4. Conclusiones	87
5. Bibliografía	88

1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se aborda el análisis químico-funcional de extractos supercríticos de *Spirulina platensis*. Como características funcionales se eligieron la actividad antioxidante y la actividad antimicrobiana dado el enorme interés que ambas actividades tienen en la industria alimentaria, como ya se comentó en el Capítulo I. Además se realizó una caracterización química de dichos extractos con el objeto de correlacionar las actividades encontradas en los extractos con su composición química.

Una de las fuentes naturales de ingredientes funcionales más apreciadas en la actualidad por su diversidad y propiedades terapéuticas son las microalgas. Entre las distintas especies estudiadas, la microalga *Spirulina platensis* ha despertado un gran interés por su elevado contenido en proteínas y por su elevado valor nutricional (¹Dillon, Phuc y col. 1995), así como por sus propiedades terapéuticas (²Mittal, Kumar y col. 1998; ³Subhashini, S.V.K. y col. 2004). Además, *Spirulina* posee un amplio espectro de pigmentos xantofílicos que, junto con la proteína ficocianina, han sido relacionados con una elevada actividad antioxidante (⁴Bhat & Madyastha 2000; ⁵Miranda, Cintra y col. 1998; ⁶Piñero Estrada, Bermejo Bescós y col. 2001; ⁷Simo, Herrero y col. 2005).

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) permite obtener extractos de muy diferentes características mediante pequeñas modificaciones en las condiciones de extracción (temperatura y tiempo) empleando muy pequeñas cantidades de disolventes en cortos periodos de tiempo (⁸King & Bott 1993). Dado que los extractos obtenidos son una mezcla de diferentes compuestos, es necesaria una etapa posterior de separación-identificación para poder caracterizar los extractos obtenidos (⁹Tena, Valcarcel y col. 1997). Entre los diferentes métodos desarrollados a tal efecto se encuentran, entre otros, la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ambas acopladas a detectores de haz de diodos (DAD) (¹⁰Simo, Ibañez y col. 2002). Independientemente de sus ventajas y desventajas ninguna de estas técnicas proporciona información directa de la actividad antioxidante de los extractos. La cromatografía en capa fina (TLC) se considera una técnica eficaz y versátil para la separación e identificación de pigmentos dependiendo de su retención relativa (R_f) en un soporte cromatográfico (¹¹Sherma 2000). Además, una vez desarrolladas las placas de TLC pueden ser teñidas con una solución de radicales, como DPPH[•] o ABTS^{•+}, proporcionando así información directa sobre su actividad antioxidante (¹²Soler Rivas, Espín y col. 2000). Por tanto, la combinación de técnicas analíticas TLC junto a HPLC-DAD-MS/MS fue la elegida para el análisis de los compuestos responsables de la actividad antioxidante en extractos supercríticos de *Spirulina platensis*.

Nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto las ventajas de la Extracción Supercrítica para la obtención de extractos con propiedades antimicrobianas a partir de diversas fuentes vegetales (¹³Santoyo, Cavero y col. 2005; ¹⁴Santoyo, Cavero y col. 2006). Además, es bien conocida la presencia de compuestos con propiedades antimicrobianas en *Spirulina*, esta actividad se debe, principalmente, a la presencia de diversos ácidos grasos (¹⁵Mendes, Nobre y col. 2003). La habilidad de los ácidos grasos para interferir con el crecimiento y supervivencia bacterianos ha sido demostrada hace décadas (¹⁶Benkendorff, Davis y col. 2005). Esta capacidad es dependiente tanto de

la longitud de la cadena como del grado de insaturación (¹⁷Kabara, Vrable *y col.* 1977). Para la determinación de los perfiles lipídicos la técnica más empleada es la cromatografía de gases. Esta técnica se ha empleado para caracterizar compuestos con actividad antimicrobiana procedentes de muy diversas fuentes vegetales (¹⁸Couladis, Chinou *y col.* 2002; ¹⁹Palic, Stojanovic *y col.* 2002; ²⁰Santoyo, Lloria *y col.* 2006; ²¹Seidel & Taylor 2004), incluyendo algas (²²Whitfield, Helidoniotis *y col.* 1999) o extractos de algas (²³Barreto & Meyer 2006; ²⁴Bernart & Gerwick 1994; ²⁵Dembitsky, Rezanka *y col.* 2003).

1.1. Objetivos y plan de trabajo

El principal objetivo de este trabajo fue el desarrollo de metodologías de análisis de los compuestos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de *Spirulina platensis* obtenidos por SFE. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos (Fig. III-1):

- obtención de los extractos de Spirulina por SFE con las condiciones fijadas mediante un diseño experimental (ver Capítulo II);
- medida de su actividad funcional: antioxidante y antimicrobiana
- desarrollo de TLC para la separación de los compuestos extraídos y teñido de las placas con una disolución de radicales para determinar la actividad antioxidante de cada banda;
- inyección en HPLC-DAD y HPLC-MS/MS para obtener información acerca de la naturaleza y pureza de los compuestos presentes en los extractos y en las bandas que presentaron mayor actividad antioxidante en TLC;
- inyección en GC-FID, previa derivatización, para obtener información acerca de los compuestos con actividad antimicrobiana de los extractos

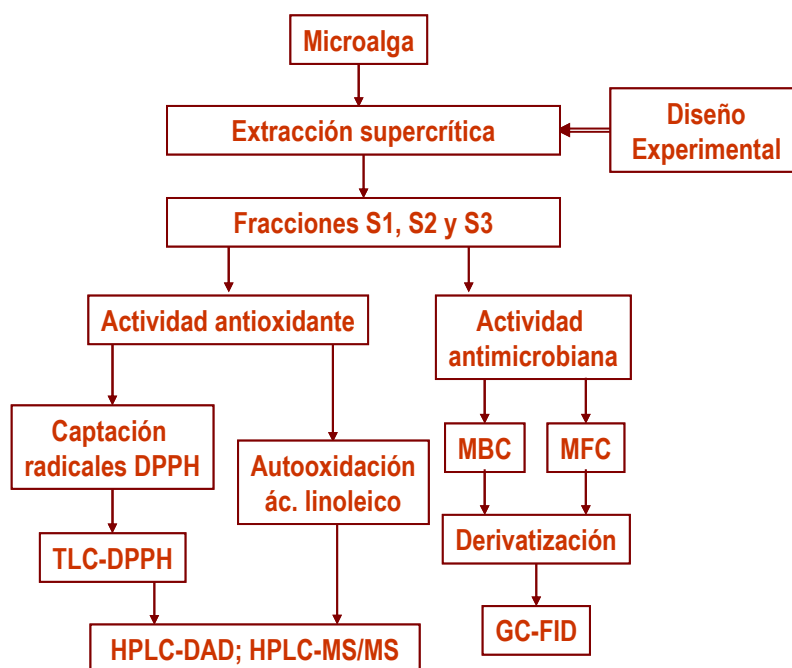


Fig. III-1.- Esquema de trabajo del proceso empleado para la caracterización químico funcional de los extractos SFE de *Spirulina platensis*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

El ácido fórmico, el ácido linoleico, el 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH), ácido ascórbico y butilhidroxitolueno se adquirieron a Sigma (Madrid), mientras que las placas de TLC Silicagel 60 F₂₅₄ fueron suministradas por Merk (Darmstad, Alemania) y la mezcla de ácidos grasos PUFA #1 Marine Source fue suministrada por Supelco (Schnelldorf, Alemania). El resto de disolventes fueron suministrados por Labscan (Dublín, Irlanda).

Las disoluciones de patrones de carotenoides y clorofilas (β -caroteno, zeaxantina, mixoxantofila, β -cryptoxantina y clorofila a) empleados en los análisis por HPLC-DAD fueron proporcionados por DHI Water & Environment (Hørsholm, Dinamarca).

2.2. Extracción supercrítica

Tanto el equipamiento, como la metodología de extracción empleada fueron las descritas en el Capítulo II

2.3. Determinación de la actividad funcional

2.3.1. Actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante de los distintos extractos se han elegido la técnica del DPPH y la de la autooxidación del ácido linoleico. Estas técnicas miden la acción de los extractos sobre dos de los distintos mecanismos que se producen en el proceso de oxidación. Así, la técnica del DPPH proporciona información sobre la capacidad de capturar radicales libres de los distintos extractos. La autooxidación del ácido linoleico, por su parte, mide la capacidad de los mismos para impedir la peroxidación lipídica.

2.3.1.1. Captación de radicales DPPH

Este ensayo se basa en el cambio de color de la molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Fig. III-2). En estado “nativo” se trata de un radical de color violeta intenso (absorbancia máxima a 516 nm), pero en presencia de agentes antirradicales, se produce su reducción, lo que conlleva una pérdida de color. Por lo tanto el ensayo se basa en la monitorización de la disminución de la absorbancia en función de la capacidad antioxidante de los extractos a distintas concentraciones y a un tiempo fijo. Como actividad antioxidante control se emplearon ácido ascórbico y butilhidroxitolueno.

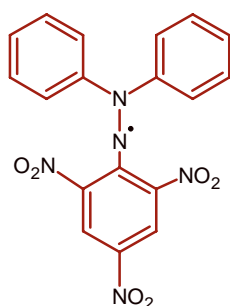


Fig. III-2.- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Las medidas de actividad antioxidante se realizaron empleando el método de captación de radicales DPPH descrito por Brand-Williams y col. (Brand-Williams, Cuvelier y col. 1995) que se resume a continuación: se preparan diferentes concentraciones del extracto a analizar en metanol. A continuación, 0,1 mL de cada disolución se añaden a 1,9 mL de una disolución de DPPH de 23,5 $\mu\text{g/mL}$. La absorbancia de la mezcla se mide a 517 nm al inicio de la reacción y a las 3 h; los valores de absorbancia obtenidos se introducen en una recta de calibrado para poder conocer la concentración de DPPH en la mezcla final de reacción. El resultado de actividad antioxidante se expresa como EC50, es decir, la concentración de extracto necesaria para reducir en un 50% la cantidad de DPPH inicial, por tanto, el extracto es tanto más activo cuanto menor sea este valor.

2.3.1.2. Método de autooxidación del ácido linoleico

Este método está basado en la medida del cambio de color producido en la oxidación del par β -caroteno-ácido linoleico. La oxidación se debe a la presencia de radicales formados durante la oxidación espontánea del ácido linoleico mediada por el oxígeno ambiental. Estos radicales y el propio oxígeno reaccionan con el β -caroteno eliminando los dobles enlaces conjugados que le confieren color naranja y transformándolo en incoloro.

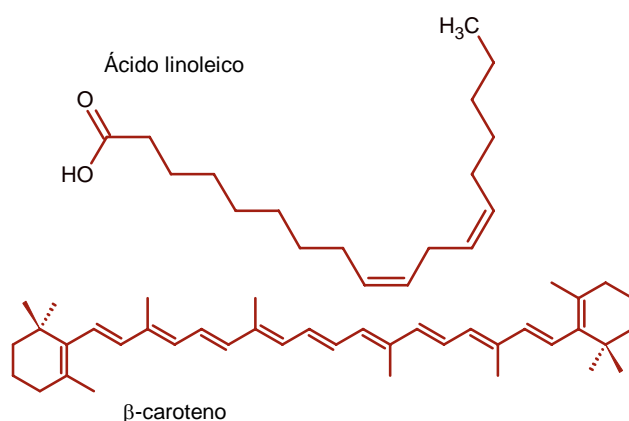


Fig. III-3.- Ácido linoleico (arriba) y β -caroteno (abajo)

El protocolo de análisis consiste en añadir ácido linoleico (10 mg) y β -caroteno (0,1 mg), ambos disueltos en diclorometano, en presencia de 100 mg de Tween 20. La mezcla formada se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se le añaden: 25 ml de agua y 0,1 ml de la muestra cuya capacidad antioxidante se pretende determinar. La emulsión se incuba a 50 °C durante 3 horas para

inducir la autooxidación. Posteriormente se mide la absorbancia de la misma a 470 nm en intervalos de tiempo determinados. La capacidad antioxidante se determina comparando el porcentaje de inhibición de los extractos con el control (²⁷Makris & Rossiter 2001). El resultado del análisis se expresa como Actividad Antioxidante (AA), definida por la Ecuación III-1.

$$AA = ((R_{\text{control}} - R_{\text{muestra}}) / R_{\text{control}}) \times 10$$

Ecuación III-1

Donde: $R = (\log_{10} \text{Abs}(t_0) / \text{Abs}(t_{180}) / 180$

En este caso, un valor de AA cercano al 100% indicaría que la muestra es lo suficientemente activa como para frenar casi completamente la oxidación espontánea del ácido linoleico, es decir, cuanto mayor sea este valor, mayor es su capacidad antioxidante.

2.3.2. Medida de la actividad antimicrobiana

2.3.2.1. Cepas utilizadas

Los extractos obtenidos mediante SFE se estudiaron individualmente frente a un panel de microorganismos que incluía: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Candida albicans* ATCC 60193 y *Aspergillus niger* ATCC 16404. De esta manera se pudo comprobar la actividad antimicrobiana de los extractos frente a una bacteria gram positiva, una gram negativa, una levadura y un hongo, respectivamente, pudiéndose determinar así, si la actividad era preferentemente bactericida, antifúngica, etc. Los cultivos madre de cada una de las cepas bacterianas se mantuvieron almacenados en agar a 4 °C. Por su parte, *C. albicans* se mantuvo en agar dextrosa a 4 °C. Las esporas de *A. niger* se obtuvieron de cultivos incubados en agar dextrosa de patata (7 días, 24 °C) y se mantuvieron en agua destilada con 0.1% de Tween 80 a 4 °C hasta su empleo como inóculos.

2.3.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas.

La concentración mínima inhibitoria (MIC), es decir, la cantidad de extracto que es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos, así como las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) y fungicidas (MFC), (cantidad de extracto que es necesaria para, además de inhibir su crecimiento, eliminar al microorganismo) se determinaron como se detalla a continuación.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se empleo un método de microdilución en medio de cultivo, tal y como recomienda la NCCLS (28NCCLS 1999). Los inóculos de las cepas bacterianas se prepararon a partir de cultivos en medio Mueller-Hinton a 37 °C. De la misma manera, la levadura y el hongo fueron cultivados durante la noche en medio dextrosa Sabouraud a 25 °C. Por ultimo, las cepas se suspendieron en medios Mueller-Hinton (bacterias) y

dextrosa Sabraud (hongo y levadura) para obtener una densidad final de 107 cfu/ml (unidad formadora de colonia por ml).

Se utilizaron placas multipocillo (96 minipocillos) añadiendo en cada pocillo 165 μ l de medio de cultivo, 5 μ l de inóculo y 30 μ l de cada una de las diferentes disoluciones de los extractos obtenidos. Las concentraciones de los extractos de *Spirulina platensis* oscilaron entre 250 mg/ml a 10 mg/ml en DMSO. Por tanto, el volumen final en cada pocillo fue de 200 μ l. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en el caso de las bacterias y a 24 °C durante 48 horas para levaduras y hongos. También se incluyeron controles negativos, en los cuales se sustituyeron los extractos de SFE por 30 μ l de DMSO que fue el disolvente empleado para solubilizar los extractos de SFE. Por otra parte, para determinar la sensibilidad de las diferentes cepas utilizadas, se emplearon cloranfenicol y anfotericina B, como patrones positivos de referencia.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se comprobó visualmente la inhibición del crecimiento, y se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) mediante la presencia de un precipitado blanco en el fondo de los pocillos. La concentración mas baja de extracto capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos se estableció como MIC. Las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas (MBC y MFC, respectivamente) se determinaron realizando subcultivos a partir de los pocillos que no mostraron ningún crecimiento. Cada ensayo se llevo a cabo por triplicado en la misma placa, y se repitió de nuevo en una placa diferente.

2.4. Caracterización química de los extractos

2.4.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

Se trata de una técnica muy empleada debido principalmente a dos factores: el bajo coste requerido y la versatilidad que ofrece para separar compuestos con sólo variar la fase móvil. De hecho la cromatografía en capa fina es una técnica especialmente recomendada para la separación de pigmentos (²⁹Quach, Steeper y col. 2004) como los que *a priori* se espera encontrar en los extractos supercríticos de Spirulina. Además, no es un ensayo destructivo y permite el empleo de los compuestos así separados para la realización de ensayos posteriores; en este sentido, en el presente estudio se empleó para evaluar de forma cualitativa la capacidad antioxidante de los extractos y de los compuestos aislados por el método de captación de radicales DPPH (¹²Soler Rivas, Espín y col. 2000).

Para llevar a cabo el análisis se depositan 9 μ l de extracto de concentración 30 mg/ml sobre la placa cromatográfica. Una vez seca la muestra, se introduce la placa en una cubeta que contiene la fase móvil. En nuestro caso, se utilizaron dos tipos de fases móviles: una apolar compuesta de éter de petróleo y acetona (3:1); y otra más polar compuesta por tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico (5:4:1). Una vez eluidas se tiñeron durante 10 segundos con una disolución de DPPH[•] de concentración 0,5 mM (¹²Soler Rivas, Espín y col. 2000), posteriormente se secaron las placas bajo una corriente de aire frío.

2.4.2. *Análisis de pigmentos mediante HPLC-DAD*

La composición de pigmentos de los extractos se evaluó empleando un equipo HPLC-DAD Varian Prostar. El método empleado es una modificación del desarrollado por Vidussi y col (³⁰Vidussi, Claustre y col. 1996). La separación se realizó en una columna Novapack C18 de 150×4,6mm y 4µm de diámetro de partícula, de acuerdo con el siguiente gradiente: fase A (Metanol:Acetato amónico 0,1N, 70:30) y fase B (Metanol). Inicialmente la composición fue 75:25, en el minuto 1 se alcanzó un 50% de B y este aumentó hasta 100% de B en el minuto 10. Esta composición se mantuvo constante hasta el minuto 35 donde se volvió a las condiciones iniciales. El caudal de fase móvil se mantuvo constante a 0,9 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL de una disolución de 10 mg de extracto en 1 mL de etanol. La identificación de los pigmentos se realizó mediante inyección de los patrones correspondientes y, cuando no se disponía de los mismos, mediante la información proporcionada por sus espectros UV-Vis.

2.4.3. *Análisis de los extractos mediante HPLC-MS*

Para llevar a cabo el acoplamiento HPLC-MS y poder obtener la mayor información posible de los extractos, se emplearon dos tipos de interfases, ambas a presión atmosférica: por un lado una interfase de electrospray (ESI), conectada a un analizador de trampa iónica (ITD) y por otro una interfase de ionización química (APCI), acoplada a un analizador de cuadrupolo. En ambos casos se utilizó ionización positiva.

En ambos métodos se empleó un sistema de HPLC de Agilent HP 1100 con una columna Zorbax XDB-C18 de 50×2,1 mm y 5 µm de diámetro de partícula. La separación se realizó en gradiente con la siguiente composición: fase A (Metanol:Ácido fórmico, 99:1), fase B (agua miliQ:Ácido fórmico, 99:1), cambiando desde un 80% de fase A hasta un 100% de fase A en 25 minutos. Flujo igual a 0,2 mL/min.

Para llevar a cabo los análisis mediante HPLC-MS con la interfase APCI se utilizó un detector HP 1100 MSD de Agilent (Fig. III-4) en el que se ajustaron los siguientes parámetros de ionización: temperatura del capilar 150°C, temperatura de vaporización 335°C, corriente de corona 4 µA, presión de N₂, 35 psi. La monitorización de iones se realizó en modo “full scan” con un intervalo de masas entre 100 a 1500 m/z para obtener un espectro completo de cada analito.

El análisis mediante HPLC-MS empleando ESI con trampa iónica se realizó en un equipo LCQ-DECA XP de Thermo (Fig. III-4). Las condiciones de ionización fueron: 4 kV de fuente de voltaje, 21 V de voltaje del capilar que se mantuvo a 290 °C. La trampa iónica permitió llevar a cabo un análisis de MS en tándem para el que se empleó una energía de colisión del 32% y un tiempo de activación de 30 ms.



Fig. III-4.- Detectores de MS empleados en el presente trabajo: HP-1100-MSD de Agilent con interfase APCI (izquierda) y LCQ-DECA XP de Thermo-Fischer con interfase ESI (derecha)

2.4.4. *Cuantificación de ácidos grasos*

La cromatografía de gases se empleó para estudiar los perfiles lipídicos de las fracciones obtenidas. Para ello, fue necesario llevar a cabo un pretatamiento de los extractos que consistió en la derivatización de los ácidos grasos presentes mediante la formación de etilésteres. A pesar de que habitualmente se suelen emplear los metilésteres de ácidos grasos, al encontrarse las muestras disueltas en etanol, se modificó el protocolo para evitar la formación de mezclas metil-etil ésteres y, por tanto, facilitar la identificación. El método de derivatización fue el siguiente: a 1 ml de muestra de concentración 25 mg/ml se le añadió 1ml de etanol:H₂SO₄ (95:5). La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 200 µl de agua mQ. Los ácidos grasos esterificados se retiraron de la mezcla mediante dos extracciones con 1 ml hexano. Para evitar la introducción de agua en el cromatógrafo de gases se añadió una punta de espátula de Na₂SO₄ a los 2 ml obtenidos con hexano. Posteriormente se inyectó 1 µl de esta solución en el cromatógrafo.

Los etilésteres se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer (modelo Autosystem XL, 950, Fig. III-5), equipado con un detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector), con la siguiente programación de temperaturas: de 100 °C a 200 °C a una velocidad de 20 °C/min, el tiempo a temperatura final fue de 20 minutos, temperatura del inyector y del detector: 200 °C, split 20:1. La identificación de los ésteres de ácidos grasos se realizó por comparación con el tiempo de retención de los correspondientes patrones.



Fig. III-5.- Cromatógrafo de Gases empleado en el presente trabajo

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos supercríticos de *Spirulina* se evaluó frente a cuatro microorganismos *Staphylococcus aureus* (bacteria gram positiva), *Escherichia coli* (bacteria gram negativa), *Candida albicans* (levadura) y *Aspergillus niger* (hongo). Debido a los bajos rendimientos obtenidos en muchos experimentos no fue posible medir la actividad antimicrobiana de todas las fracciones. Se eligieron los experimentos 1, 5, 6, 9 y 10 (separadores 1 y 2) realizados con CO₂+etanol y los experimentos 11, 15, 16, 19 y 20 (separadores 2) realizados con CO₂; véase Tablas II-3 y II-4. La elección de estos experimentos se basó no sólo en la que el rendimiento obtenido permitió medir la actividad frente a todos los microorganismos, sino que además con ellos se pudo evaluar la práctica totalidad del intervalo de densidades. Los resultados de la medida de actividad antimicrobiana se pueden ver en la Tabla III-1.

Los resultados obtenidos muestran que la levadura (*C. albicans*) resultó ser el microorganismo más sensible a los extractos de *Spirulina*, dado que presentó los valores más bajos de MFC. Por otro lado el organismo menos sensible fue el hongo (*A. niger*), de hecho sólo dos extractos presentaron algo de actividad para inhibir el crecimiento del mismo.

Tabla III-1.- Actividades antimicrobianas de los extractos supercríticos de *Spirulina platensis*.

Exp.	Pext (bar)	Text (°C)	<i>E. coli</i> MBC [◇]	<i>S. aureus</i> MBC [◇]	<i>C. albicans</i> MFC [◇]	<i>A. niger</i> MFC [◇]
1.S1	220	55	25	25	15	>35
1.S2			15	15	10	35
5.S1	361	55	30	25	15	>35
5.S2			20	20	10	>35
6.S1	220	26,7	20	20	10	>35
6.S2			10	10	10	35
9.S1	120	35	15	20	10	>35
9.S2			20	20	15	>35
10.S1	320	35	25	25	15	>35
10.S2			20	20	10	>35
11.S2	220	55	20	15	10	>35
15.S2	361	55	15	15	10	>35
16.S2	220	26,7	25	20	15	>35
19.S2	120	35	25	20	10	>35
20.S2	320	35	25	20	10	>35
Antibiótico de referencia [◇]			10	10	100	150

[◇] MBC y MFC expresadas en mg/ml para los extractos y en µg/ml para el antibiótico de referencia

Los extractos obtenidos con CO₂+etanol presentaron una mayor actividad (por supuesto, una vez evaporado el etanol) en el segundo separador, salvo el experimento 9 donde la tendencia se invirtió. Comparando los resultados obtenidos en los segundos separadores (S2) se pudo ver, que para todos los microorganismos analizados, el más activo fue el experimento 6 (220 bar, 26,7 °C) seguido por los experimentos 1 y 10. Estos resultados indican que, cuando se trabaja a presiones por

encima de los 120 bar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana precipitan selectivamente en el segundo separador. Además, presiones de 220 bar parecen ser óptimas para la extracción de compuestos con actividad antimicrobiana ya que por encima de 220 bar esta actividad se reduce, probablemente debido a un efecto de dilución de estos compuestos. Por otro lado, al comparar los experimentos 1 y 6, realizados ambos a 220 bar pero a distintas temperaturas, se pudo ver como el aumento de la temperatura de extracción produjo una disminución de la actividad antimicrobiana.

En cuanto a las extracciones realizadas empleando únicamente CO₂ como agente de extracción, la mayor actividad antimicrobiana se obtuvo en el experimento 15, realizado a la mayor presión (361 bar), seguido del 11 realizados ambos a temperaturas medias. Estos datos indican que cuando se trata de CO₂ puro las mejores condiciones para obtener extractos con alta actividad antimicrobiana son temperaturas medias y presiones medio-altas.

La actividad antimicrobiana de las microalgas del género al que pertenece *Spirulina*, *Cyanobacterium*, ha sido atribuida a diferentes compuestos pertenecientes a un amplio intervalo de familias químicas (³¹Borowitzka 1995; ³²Kreitlow, Mundt *y col.* 1999; ³³Ozdemir, Karabay *y col.* 2004). La actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de *Spirulina* ha sido atribuida a la presencia de ácido γ -linoleico (³⁴de Mule, de Caire *y col.* 1996), un ácido graso poliinsaturado presente en elevada concentración en esta microalga (¹⁵Mendes, Nobre *y col.* 2003). Por este motivo se llevó a cabo un análisis detallado del perfil de ácidos grasos presentes en los extractos. Tal y como se comentó en la sección III.2, el análisis de ácidos grasos por GC-FID fue precedido de un paso de esterificación para aumentar la volatilidad de los mismos.

En todas las fracciones analizadas por cromatografía de gases se observó que el perfil lipídico obtenido era independiente de la presión y temperatura a la que se produjo la extracción, por lo tanto, evidenció la inexistencia de diferencias cualitativas entre los diferentes extractos. Por el contrario, sí pueden apreciarse ligeras diferencias en la distribución de ácidos grasos entre los dos separadores (Tabla III-2 y Fig. III-6), aumentando la cantidad de ácidos grasos de cadena corta y media en las fracciones recogidas en el separador 2 y los de cadena larga en el S1.

Tabla III-2.- Distribución de ácidos grasos en los dos separadores de la extracción 1

Compuesto	t _R (min.)	% área S1	% área S2
Ácido láurico, C12	5,84	3,53	19,22
Ácido mirístico, C14	7,95	2,89	1,38
Ácido palmítico, C16	10,05	44,37	36,61
Ácido palmitoleico, C16:1 ω 6	10,30	5,92	5,80
Ácido esteárico, C18	13,95	7,22	8,93
Ácido oleico, C18:1 ω 6	14,61	30,62	25,06
Ácido linoleico, C18:2 ω 6	15,12	0,92	0,66

A pesar de que en la literatura sobre *Spirulina* (³⁵Abalde, Cid *y col.* 1995) están descritos otros ácidos grasos e incluso una fracción de lípidos polares, estos están ausentes de las fracciones obtenidas, de lo cual se puede concluir que la extracción con fluidos supercríticos, al menos en los intervalos de presión y temperatura empleados, no es un buen medio para obtener extractos ricos en

dicha fracción lipídica. No obstante, la matriz de extracción (es decir, el residuo que permanece en la celda de extracción) se vería enriquecida en lípidos polares.

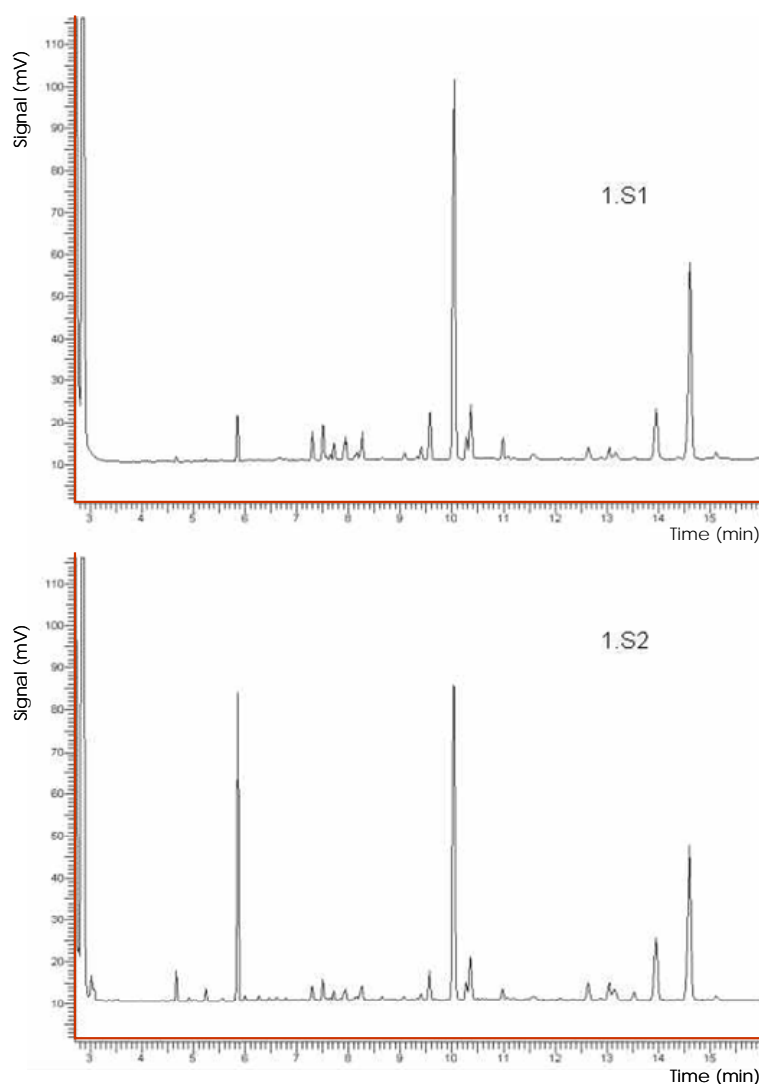


Fig. III-6.- Cromatogramas de la extracción 1 obtenidos por GC-FID, en la parte superior se puede ver la fracción correspondiente al separador 1 y en la inferior al separador 2

Los resultados obtenidos en los análisis de los extractos por GC-FID mostraron que el contenido en ácido linoleico era relativamente bajo, por lo que parece que la actividad antimicrobiana no pueda ser atribuida únicamente a la presencia de este compuesto. No obstante, dado que el análisis reveló la presencia de otros ácidos grasos cuya actividad antimicrobiana ha sido probada (¹⁶Benkendorff, Davis *y col.* 2005; ³⁶Ouattara, Simard *y col.* 1997), la actividad antimicrobiana de los extractos pudo ser debida a efectos sinérgicos entre esos ácidos grasos. Comparando los análisis de ácidos grasos obtenidos en las fracciones S1 y S2, un aspecto muy notable es la diferencia en concentración relativa de ácido laurico, que en S2 fue mucho mayor que en S1. Este hecho, podría estar relacionado con la mayor actividad encontrada en esta fracción.

3.2. Actividad antioxidante

Como se expuso en el apartado de Materiales y Métodos, la actividad antioxidante se midió por dos métodos ampliamente aceptados por la comunidad científica: captación de radicales DPPH y autooxidación del ácido linoleico. Un hecho diferenciador de ambos ensayos es la polaridad del medio de reacción, metanol para el primer caso y una emulsión o/w (*oil in water*) para el segundo. Los resultados obtenidos en ambos ensayos son diferentes pero complementarios puesto que el parámetro medido en ambos es diferente. De hecho, lo más habitual en la literatura es emplear varios tipos de ensayos para obtener un dato cuantitativo real sobre la capacidad antioxidante de la materia prima objeto de estudio.

3.2.1. Captación de radicales DPPH

La Tabla III-3 muestra los valores de EC50 expresados en μg de extracto/ml en el medio final de reacción. A la vista de estos resultados (Tabla III-3) se puede deducir que el extracto que proporcionó una mayor actividad antioxidante fue el obtenido en las condiciones del experimento 13-S1, esto es, 320 bar y 75°C, empleando CO_2 puro.

Tabla III-3.- Valores de actividad antioxidante medida por el método de captura de radicales DPPH y expresada como EC50 en $\mu\text{g}/\text{mL}$

Exp.	Presión (bar)	Temp. (°C)	% CO_2 *	Separador 1	Separador 2
1	220	55	90,0	71,06 \pm 2,54	73,49 \pm 2,40
2	220	55	90,0	66,65 \pm 0,16	63,15 \pm 1,66
3	320	75	90,0	82,8 \pm 0,08	122,8 \pm 2,06
4	120	75	78,5	93,83 \pm 0,66	106,8 \pm 0,78
5	361	55	91,1	168,1 \pm 0,30	131,93 \pm 0,02
6	220	26,7	91,3	174,62 \pm 1,15	112,31 \pm 0,41
7	78	55	69,1	111,79 \pm 0,02	204,49 \pm 0,16
8	220	83,3	87,6	96,57 \pm 0,99	122,02 \pm 1,07
9	120	35	89,8	129,56 \pm 0,52	166,94 \pm 0,22
10	320	35	91,5	253,41 \pm 1,63	64,44 \pm 1,20
11	220	55	100,0	133,51 \pm 0,09	186,16 \pm 0,86
12	220	55	100,0	147,2 \pm 1,03	184,68 \pm 0,60
13	320	75	100,0	19,89 \pm 1,07	129,63 \pm 1,12
14	120	75	100,0	200,29 \pm 0,90	166,53 \pm 0,30
15	361	55	100,0	94,42 \pm 0,82	92,69 \pm 1,42
16	220	26,7	100,0	85,28 \pm 0,26	193,69 \pm 0,82
17	78	55	100,0	310,6 \pm 1,07	297,72 \pm 0,30
18	220	83,3	100,0	105,23 \pm 1,16	138,07 \pm 2,36
19	120	35	100,0	48,76 \pm 0,27	240,02 \pm 0,05
20	320	35	100,0	101,49 \pm 2,32	197,53 \pm 0,52
* % en peso de la mezcla CO_2 +etanol a las condiciones de extracción					

A pesar de recoger tres fracciones en cada extracción tan sólo se realizó este ensayo para las fracciones correspondientes a los separadores 1 y 2 puesto que la cantidad recogida en el tercer separador o trampa criogénica no fue suficiente para llevar a cabo el ensayo.

Respecto a las extracciones realizadas con modificador, el mejor resultado se obtuvo en el punto central del diseño, experimentos 1 y 2, en la fracción recogida en el separador 2. En estas extracciones (220 bar y 55 °C) no se aprecia tanta diferencia de actividad antioxidante entre el primer y el segundo separador.

En cualquier caso ninguna de las muestras resultó poseer un poder antioxidante superior al del antioxidante control, ácido ascórbico (E-300), cuya EC50 resultó ser de 2,3 µg/ml, o al del BHT con 18,1 µg/ml de EC50.

3.2.2. Autooxidación del ácido linoleico

En las siguientes tablas (Tabla III-4 y Tabla III-5) se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de autooxidación del ácido linoleico expresados como AA (ver Ecuación III-1), medidos a dos concentraciones diferentes.

Tabla III-4.- Actividad antioxidante medida por el método de autooxidación del ácido linoleico medida a dos concentraciones diferentes para cada fracción, expresada junto con la desviación típica. Extracciones con CO₂ y etanol.

Exp.	Separador 1		Separador 2	
	12,5 mg/ml	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	6,25 mg/ml
1	94,74 ±0,78	90,12 ±0,05	78,44 ±3,04	47,40 ±0,51
2	94,17 ±0,21	93,20 ±0,36	83,72 ±0,54	60,40 ±0,63
3	94,16 ±0,09	87,28 ±1,59	52,37 ±2,45	32,17±0,24
4	76,57 ±1,33	52,35 ±1,54	37,57 ±2,30	21,22 ±2,36
5	87,45 ±1,68	76,75 ±1,98	47,62 ±1,60	12,52 ±3,57
6	84,01 ±0,50	54,30 ±0,73	61,00 ±0,82	30,13 ±2,52
7	83,92 ±0,28	70,12 ±0,20	15,68 ±1,42	0,21 ±0,03
8	89,43 ±0,69	80,37 ±0,43	61,80 ±2,25	28,92 ±2,35
9	67,82 ±1,29	55,13 ±2,71	35,73 ±4,79	8,15 ±0,68
10	93,27 ±0,04	91,33 ±0,40	74,13 ±0,24	43,28 ±5,30

Como se puede observar, las extracciones que produjeron un mejor resultado fueron las realizadas con etanol, concretamente los experimentos 1, 2 (ambos réplicas en el centro del diseño a 220 bar y 55°C), 3 (320 bar y 75°C) y 10 (320 bar y 35°C). Sin emplear modificador la mejor resultó ser la número 13 (320 bar y 75 °C). En cualquier caso los compuestos responsables de la actividad antioxidante fueron recogidos mayoritariamente en el primer separador.

Para poder comparar estos datos de actividad antioxidante con un producto empleado habitualmente en la industria alimentaria se realizó el mismo ensayo con el aditivo E-321 (butilhidroxitolueno, BHT), que proporcionó una inhibición de la oxidación del linoleico del 95,26%±1.25 empleando 0,5 mg/ml y un 80.85% ±1.63, para 0,25 mg/ml. Como se puede observar la actividad antioxidante del BHT es mucho mayor (nótese la concentración a la que está medido) que la de los extractos supercríticos de Spirulina. En este punto es importante hacer hincapié en la

controversia que rodea al BHT. Se trata de un análogo sintético de la tiroxina, por lo que es capaz de reemplazarla en reacciones biológicas. *In vivo* actúa desacoplando el transporte de electrones en la mitocondrias del hígado, lo que puede llegar a provocar hipertrofia del hígado que puede derivar incluso en tumores (³⁷Sun, Dwyer-Nield *y col.* 2003). De hecho la legislación española sobre aditivos (Real Decreto 142/2002, BOE 20 febrero 2002, núm. 44, pág. 6756, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización) contempla un uso altamente restringido para el mismo, 100 mg BHT/Kg de alimento y tan sólo puede emplearse en grasas y sopas deshidratadas.

Tabla III-5.- Actividad antioxidante medida por el método de autooxidación del ácido linoleico medida a dos concentraciones diferentes para cada fracción, expresada junto con la desviación típica. Extracciones con CO₂ puro.

Exp.	Separador 1		Separador 2	
	12,5 mg/ml	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	6,25 mg/ml
11	68,37 ±1,16	41,39 ±3,59	63,15 ±0,57	20,50 ±1,71
12	71,96 ±1,13	37,92 ±3,58	64,53 ±0,91	23,16 ±2,54
13	94,56 ±0,12	91,00 ±1,52	88,72 ±0,39	61,60 ±6,70
14	52,65 ±0,69	26,84 ±3,75	48,17 ±3,40	23,60 ±2,46
15	82,98 ±0,54	50,27 ±2,12	90,22 ±0,19	72,41 ±1,38
16	84,18 ±0,18	60,21 ±0,80	56,96 ±3,41	20,96 ±1,73
17	55,27 ±4,91	31,02 ±3,61	19,76 ±2,66	3,95 ±0,61
18	85,16 ±0,03	56,65 ±0,17	38,07 ±1,56	18,62 ±4,11
19	65,20 ±5,66	17,28 ±1,22	47,29 ±16,84	28,11 ±3,94
20	26,19 ±1,68	16,36 ±0,65	75,70 ±0,41	35,24 ±0,66

Al igual que en el ensayo de captación de radicales DPPH, también se empleó ácido ascórbico (E-300) como control de actividad antioxidante, la inhibición de una disolución de 1 mg/ml fue del 54,0% ±1, lo que supone una actividad comparativamente menor a la obtenida en el ensayo de captación de radicales. Esta menor actividad puede deberse al medio de reacción empleado, ya que para ejercer su acción el ácido ascórbico debe penetrar en las micelas de ácido linoleico-tween.

Como se ha comentado anteriormente, la TLC puede emplearse como método adicional para obtener un mayor grado de caracterización de los extractos. En este caso se trataría de una doble caracterización, química y funcional, puesto que, tras la separación de los compuestos, la tinción con el radical DPPH permite realizar un análisis de la actividad antioxidante de los mismos.

Empleando el procedimiento descrito en la sección 2.4.1, se analizaron las fracciones correspondientes a los separadores 1 y 2. En la parte inferior de las placas se indica el número de extracción y el separador al que corresponde (en cada una de las “calles”). Asimismo, se eluyeron patrones de β -caroteno y luteína (Fig. III-11 y Fig. III-13), lo que permite asignar las bandas correspondientes a estos compuestos en los extractos de Spirulina.

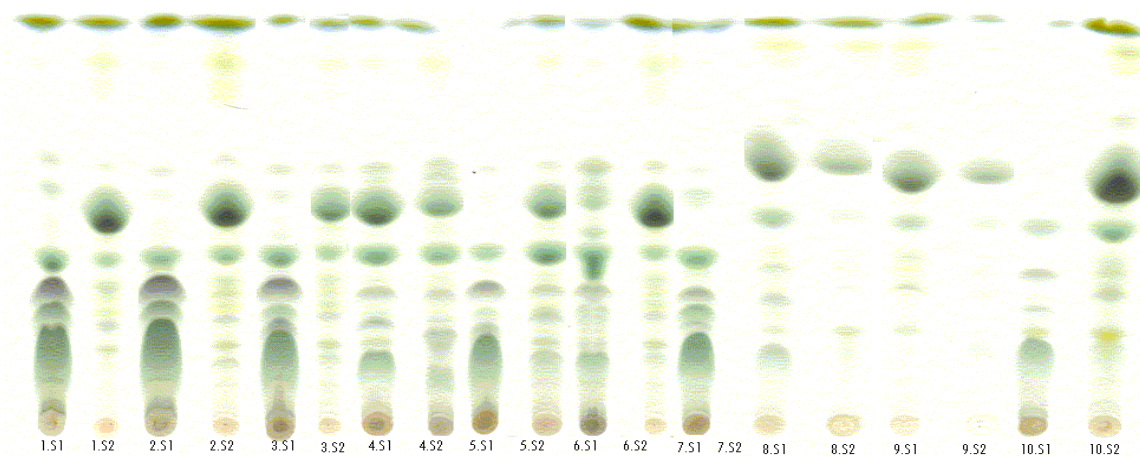


Fig. III-7.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar (éter de petróleo-acetona) para los extractos 1 a 10.

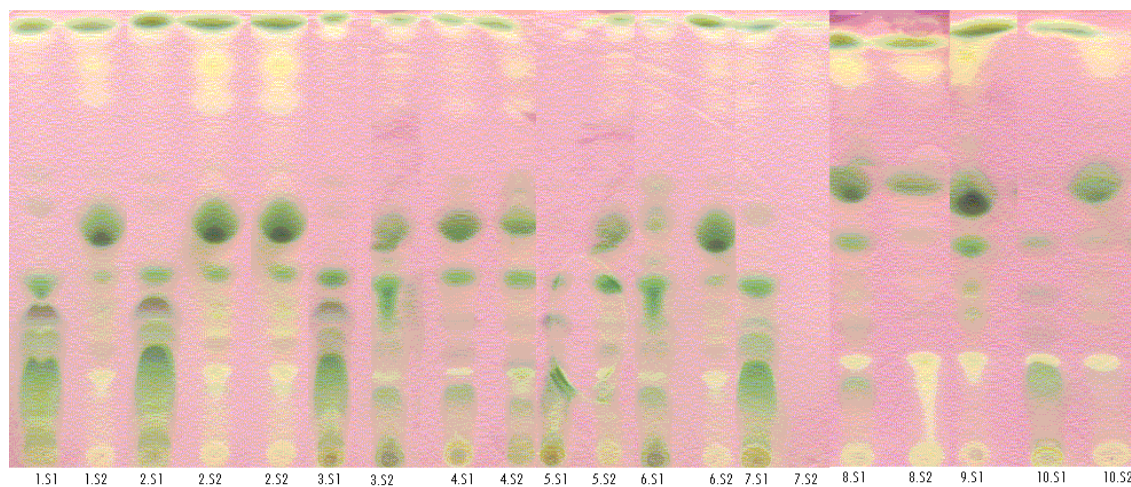


Fig. III-8.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar para los extractos 1 a 10 y revelada con DPPH 0,5 mM.

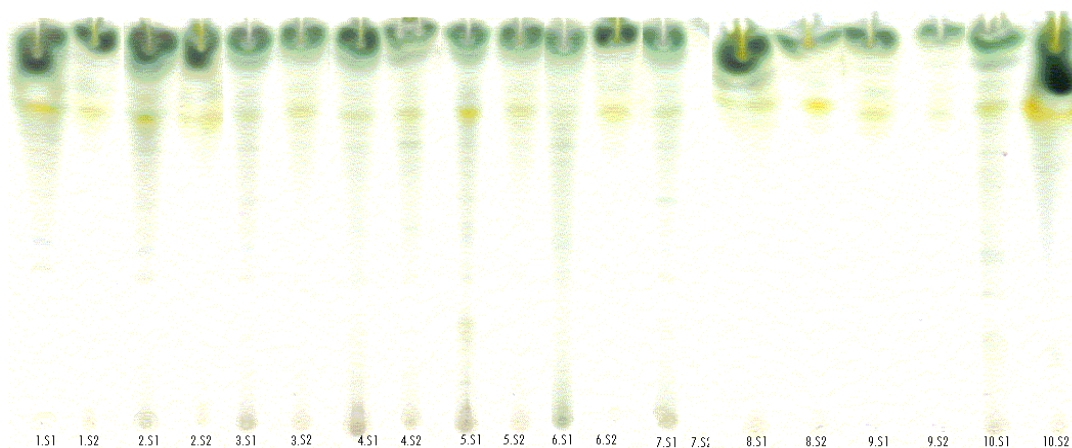


Fig. III-9.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar (tolueno-acetato de etilo-ác. fórmico) para los extractos 1 a 10.

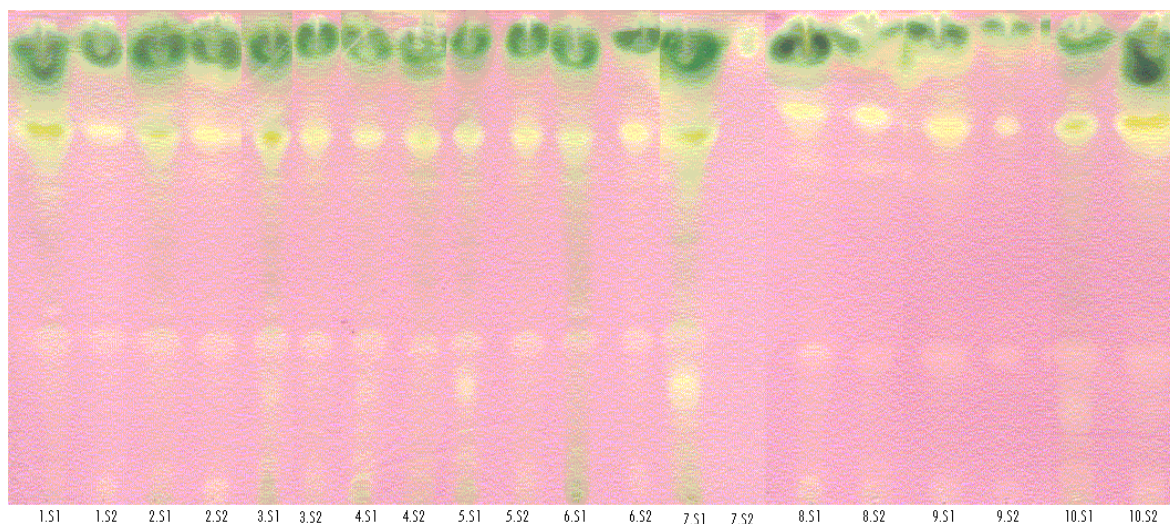


Fig. III-10.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar para los extractos 1 a 10 y revelada con DPPH 0,5 mM

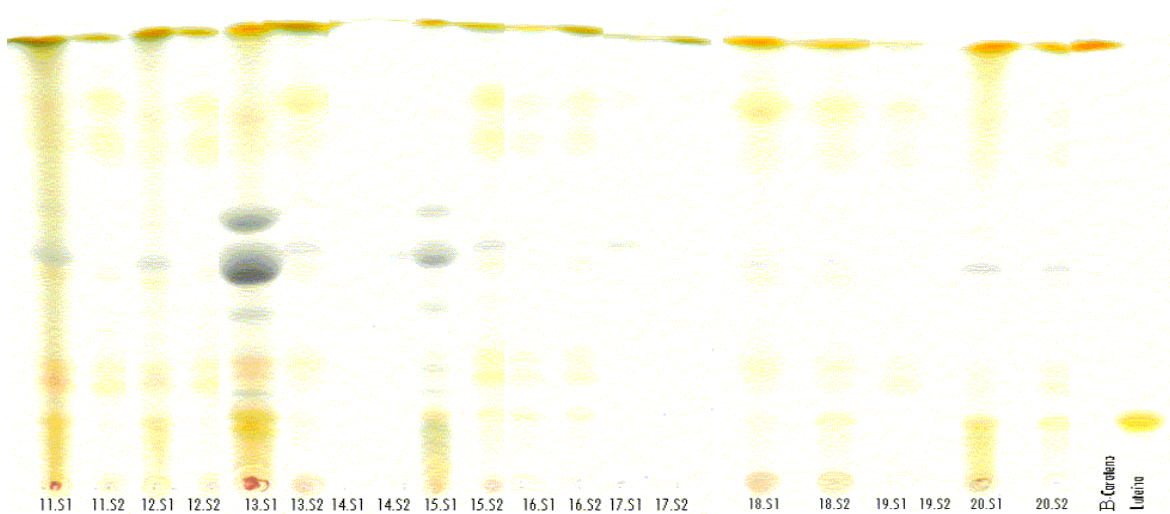


Fig. III-11.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar (éter de petróleo-acetona) para los extractos 11 a 20 y patrones comerciales de dos carotenoides, β -caroteno y luteína.

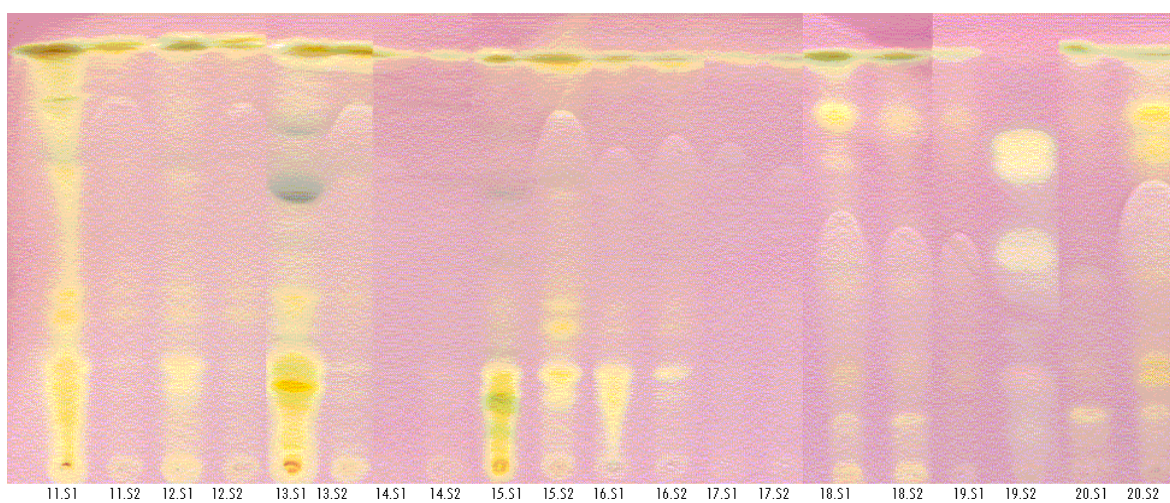


Fig. III-12.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar para los extractos 11 a 20 y revelada con DPPH.

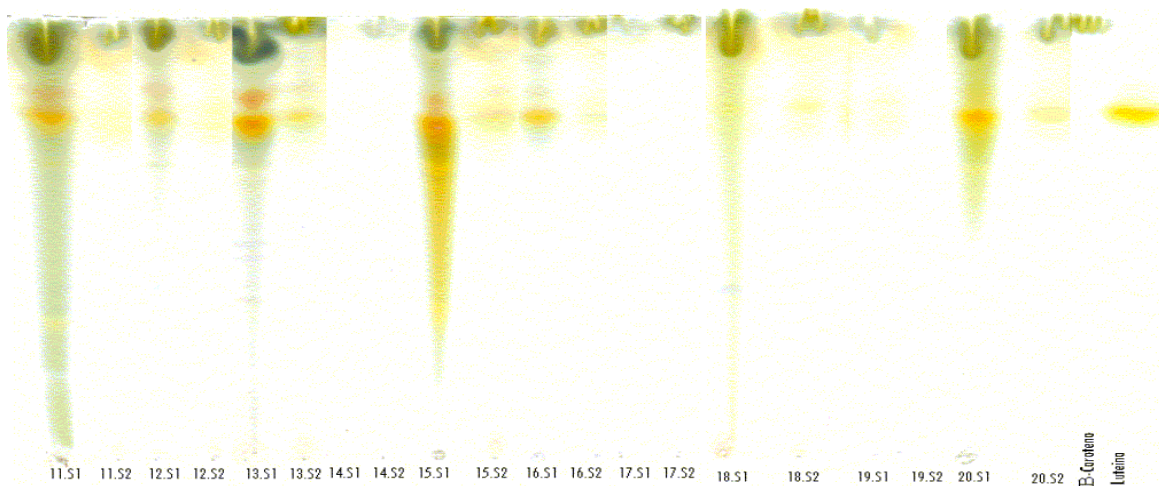


Fig. III-13.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar (tolueno-acetato de etilo-ác. fórmico) para los extractos 11 a 20 y patrones comerciales de dos carotenoides, β -caroteno y luteína

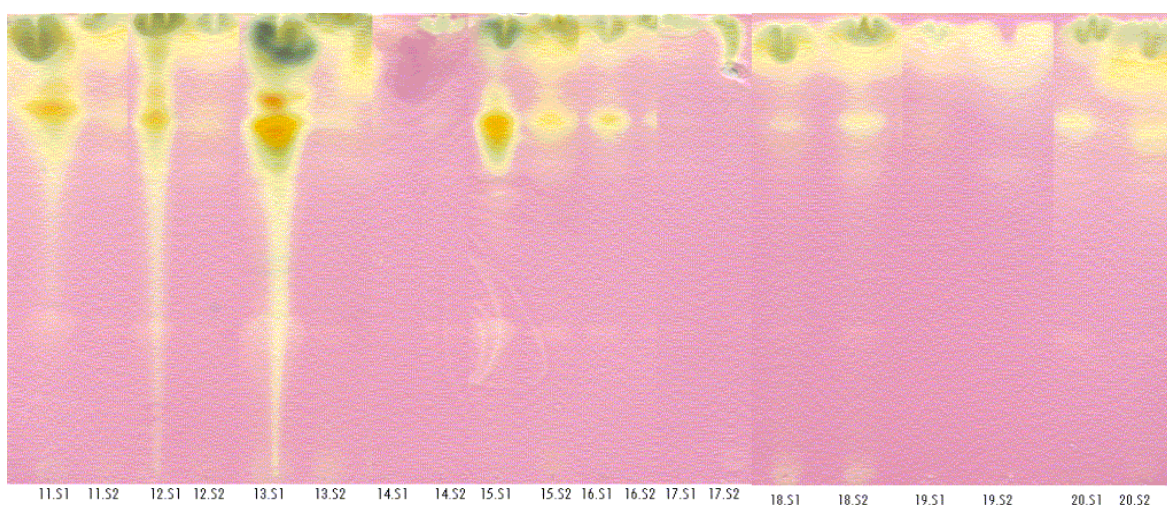


Fig. III-14.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar (tolueno-acetato de etilo-ác. fórmico) para los extractos 11 a 20 y revelada con DPPH

Como se puede ver en las placas en las que se empleó la fase móvil menos polar (éter de petróleo-acetona, 3:1), Fig. III-7 y Fig. III-11, en la parte superior de la placa se pueden distinguir los diferentes carotenoides y otros compuestos de baja polaridad y en las que se utilizó la fase más polar (tolueno-acetato de etilo-ác. fórmico, 5:4:1) las familias reveladas pertenecen a los polifenoles, xantofilas y clorofilas.

Por comparación con los patrones de luteína y β -caroteno (Fig. III-11 y Fig. III-13) se puede ver que los carotenoides más apolares eluyen en ambas fases junto con el frente del disolvente. Otros carotenoides con grupos funcionales polares (hidroxilos en el caso de la luteína) recorren una menor distancia con la fase menos polar. Tanto en las extracciones con modificador (1–10) como en las que no se empleó éste (11–20) se puede ver más cantidad de bandas en las placas de TLC en las que se empleó una fase móvil menos polar, lo que indica la baja polaridad del fluido extractante, siendo esta algo menor en el caso de las extracciones con CO_2 puro.

A la vista de los resultados obtenidos se deduce la presencia de una mayor cantidad de derivados de clorofilas en las extracciones realizadas con etanol. Comparando los dos separadores de una misma extracción se puede ver una mayor presencia de compuestos de la familia de las clorofilas en el separador 1 que en el 2.

Para poder determinar cuáles de estas familias de compuestos presentaban actividad de captación de radicales DPPH las placas fueron teñidas como se indicó anteriormente. Las bandas que tras la tinción con DPPH, proporcionan un color amarillo fueron aquellas a las que se les atribuyó poder antioxidante, así las bandas correspondientes a carotenoides presentan colores amarillo anaranjados tras la tinción.

Se empleó HPLC-DAD para aproximar los perfiles generales de los extractos obtenidos a una clasificación tentativa por familias de los compuestos (basada en la información proporcionada por los espectros de absorción UV-Visible).

En la Fig. III-15 se muestran espectros típicos de las familias de compuestos obtenidos en los extractos de Spirulina. Por comparación con espectros hallados en la bibliografía se puede realizar una identificación por familias de compuestos. Por ejemplo, los carotenoides presentan un perfil típico con tres máximos (Fig. III-15A y B) cuya longitud de onda y relación III/II es variable en función de los grupos funcionales presentes en la molécula. Las clorofilas también presentan un perfil muy característico (Fig. III-15C) con dos máximos, uno en la zona 380–430 nm y otro a 640–660 nm. La última familia de compuestos cuya presencia es reseñable en los extractos de Spirulina son los derivados fenólicos (Fig. III-15D), cuya principal característica es un máximo de absorción cercano a 280 nm.

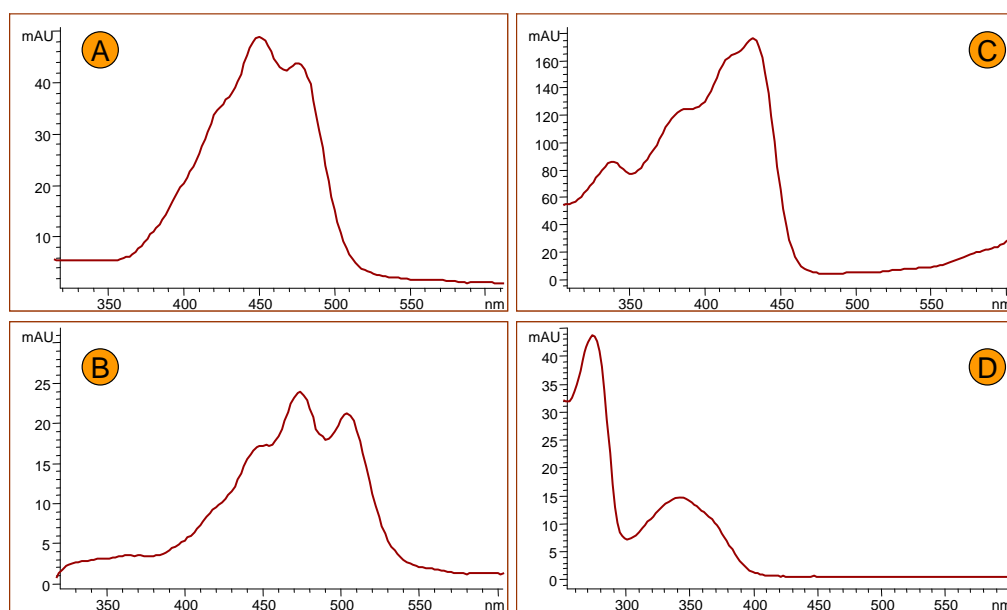


Fig. III-15.- Espectros UV-Visible, de las principales familias de compuestos encontrados en los extractos de *Spirulina platensis*: carotenoides (A y B), clorofilas (C) y compuestos fenólicos (D). Todos ellos han sido obtenidos con equipo de HPLC-DAD empleado en el presente trabajo HP 1090.

En la Fig. III-16 se muestran los cromatogramas obtenidos en la extracción 1 ($P_{\text{ext}}=220\text{bar}$, $T_{\text{ext}}=55^{\circ}\text{C}$, 10% etanol), separadores 1 y 2, en los que se observan los diferentes perfiles obtenidos durante la extracción y fraccionamiento de Spirulina.

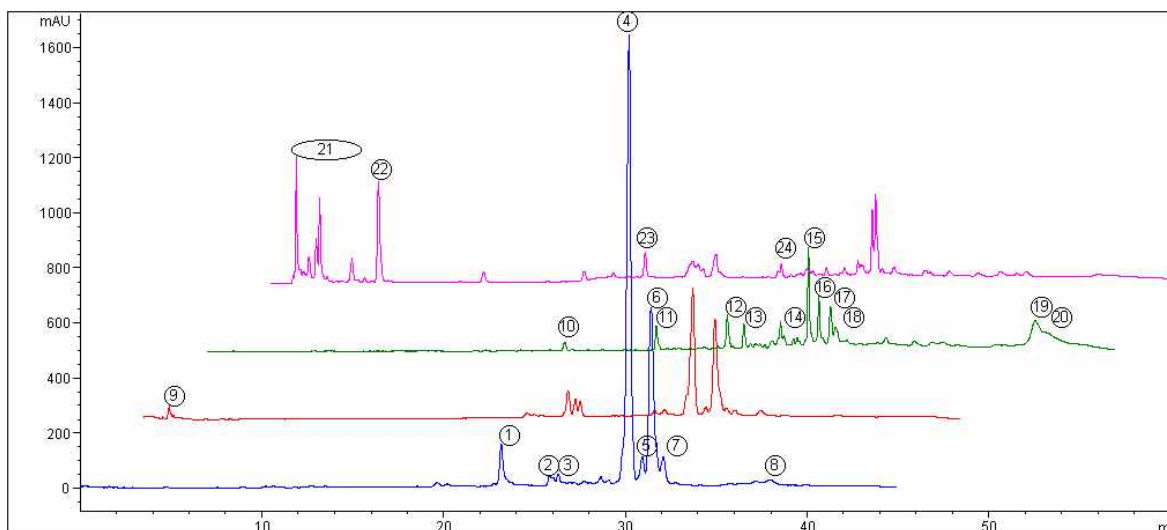


Fig. III-16.- Cromatogramas obtenidos en HPLC de la extracción 1. De abajo a arriba: separador 1 a 440 nm y 230 nm y separador 2 440 nm, 230 nm.

En la siguiente tabla se muestran las identificaciones tentativas de los distintos compuestos presentes en los diferentes extractos analizados y que se han caracterizado, como ya se ha comentado anteriormente, por su espectro de absorción UV-Vis. Los cromatogramas elegidos para confeccionar dicha tabla son los de la Fig. III-16 (extracción 1, separadores 1 y 2) por ser esta extracción una de las que mejores resultados ha permitido obtener en ambos ensayos de medida de la actividad antioxidante.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las distintas extracciones de Spirulina con CO₂ y CO₂+etanol en función de las condiciones del diseño experimental. Debido a la incompleta identificación de estos compuestos, no fue posible llevar a cabo la cuantificación de los mismos. A efectos comparativos, se presentan los perfiles de HPLC de los distintos extractos en forma de % áreas normalizadas (Tabla III-7 y

Considerando los resultados anteriormente mencionados, se seleccionaron los extractos correspondientes a los separadores 1 y 2 del experimento 1 para su caracterización química exhaustiva mediante HPLC-MS. Se realizaron dos tipos de análisis, cada uno con una interfase (ESI y APCI) y un analizador de iones diferente (trampa iónica y cuadrupolo, respectivamente). La ionización con electrospray se suele emplear para compuestos polares como polifenoles, mientras que la ionización química es más utilizada para compuestos apolares como por ejemplo carotenoides (³⁸Tsao & Yang 2003). Se eligieron ambas interfases con el principal objetivo de trabajar en las mejores condiciones para los distintos tipos de compuestos de interés.

Tabla III-8). La longitudes de onda seleccionadas para obtener dichas áreas normalizadas están basadas en los máximos de absorción de las principales familias de compuestos esperadas: 230 y 280nm para los derivados fenólicos, 440 nm para carotenoides y clorofilas y 598 nm para clorofilas (máxima longitud de onda alcanzada por la lámpara del detector del equipo empleado, HP 1090).

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que la proporción de clorofilas y derivados ($\lambda=598\text{nm}$) obtenidos es mayor en las extracciones realizadas con etanol. En estas

extracciones, en general, las clorofilas precipitan en el primer separador, pero este comportamiento puede variar en función de la presión y temperatura de extracción empleada en cada uno de los experimentos.

Tabla III-6.- Identificación tentativa de las familias de compuestos extraídos de la microalga *Spirulina platensis* (condiciones experimento 1) correspondiente a los cromatogramas de la Fig. III-16.

Nº Pico	t _R (min.)	Máximos de absorción (nm)					Familia a la que pertenece	
1	23,1	425	455	485			Carotenoides	Extracción 1, separador 1
2	25,8	425	445	475			Carotenoides	
3	26,3	340	425	445	475		Carotenoides	
4	30,2	260	340	385	430	598	Clorofilas	
5	30,9	425	598				Clorofilas	
6	30,4	425	598				Clorofilas	
7	32,1	270	340	385	430	598	Clorofilas	
8	37,9	405	430	455			Carotenoides	
9	1,6	280	380				Polifenoles	
10	19,7	280	408	420	435		Carotenoides	Extracción 1, separador. 2
11	24,7	265	405				Carotenoides	
12	28,6	435					Carotenoides	
13	29,5	445					Carotenoides	
14	31,5	280	415				Carotenoides	
15	33,1	280	425	450	485		Carotenoides	
16	33,6	280	435				Carotenoides	
17	34,3	280	425	445	475		Carotenoides	
18	34,5	300	430	455	480		Carotenoides	
19	45,2	280	405	425	455		Carotenoides	
20	45,3	420	450	480			Carotenoides	
21	1,4-4,5	280					Polifenoles	
22	5,4	370					Polifenoles	
23	20,5	320					Polifenoles	
24	28,1	350					No identificado	

También se puede apreciar que la fracción de compuestos que presentan absorción a 230 nm es la más abundante en el tercer separador, independientemente de que la extracción haya sido realizada con o sin etanol. Esto es debido a que los compuestos observados a otras longitudes de onda presentan mayores pesos moleculares y por lo tanto son menos solubles a bajas densidades de CO₂.

Analizando conjuntamente la actividad antioxidante (medida por el método de autooxidación del ácido linoleico) y la tabla de porcentaje de áreas normalizadas, es posible observar un mismo

patrón de composición en aquellas fracciones con mayor poder antioxidante (extracciones 1, 2, 3 y 10 en el separador 1); así, en estas extracciones el perfil corresponde a aproximadamente un 40% de compuestos fenólicos (longitudes de onda 230 y 280 nm), un 50% de carotenoides (dato obtenido para los compuestos pertenecientes a esta familia medidos a 440 nm) y entre un 4 y un 7% de clorofilas (medidas a 598 nm).

Tabla III-7.- Perfiles obtenidos por HPLC de los extractos realizados con CO₂ y etanol

Exp.		Áreas relativas (%)				
		230nm	280nm	440nm	598nm	Total
1	S1	21,39	20,41	50,49	7,70	100
	S2	41,22	22,01	36,10	0,66	100
	S3	37,55	34,69	26,99	0,77	100
2	S1	21,28	18,40	53,00	7,32	100
	S2	40,74	27,57	31,35	0,35	100
	S3	37,96	34,89	26,61	0,54	100
3	S1	21,91	17,94	53,27	6,88	100
	S2	55,84	20,66	23,33	0,16	100
4	S1	29,89	19,19	47,39	3,53	100
	S2	22,60	44,62	30,03	2,75	100
	S3	39,21	42,82	17,66	0,31	100
5	S1	45,86	18,07	32,69	3,38	100
	S2	37,78	18,99	40,40	2,83	100
	S3	34,45	19,46	43,07	3,02	100
6	S1	35,49	18,63	42,74	3,14	100
	S2	41,67	16,60	40,96	0,77	100
	S3	52,59	21,55	24,97	0,88	100
7	S1	29,31	18,91	46,75	5,03	100
	S2	36,72	8,85	53,94	0,49	100
8	S1	40,10	18,91	39,35	1,65	100
	S2	52,79	23,62	22,93	0,66	100
	S3	54,68	25,53	19,41	0,37	100
9	S1	36,13	15,15	48,66	0,06	100
	S2	42,01	20,10	35,44	2,45	100
	S3	41,57	32,53	23,61	2,29	100
10	S1	25,90	16,23	54,11	3,76	100
	S2	36,33	15,77	45,51	2,40	100
	S3	53,65	27,55	18,61	0,18	100

Considerando los resultados anteriormente mencionados, se seleccionaron los extractos correspondientes a los separadores 1 y 2 del experimento 1 para su caracterización química exhaustiva mediante HPLC-MS. Se realizaron dos tipos de análisis, cada uno con una interfase (ESI y APCI) y un analizador de iones diferente (trampa iónica y cuadrupolo, respectivamente). La ionización con electrospray se suele emplear para compuestos polares como polifenoles, mientras

que la ionización química es más utilizada para compuestos apolares como por ejemplo carotenoides (³⁸Tsao & Yang 2003). Se eligieron ambas interfases con el principal objetivo de trabajar en las mejores condiciones para los distintos tipos de compuestos de interés.

Tabla III-8.- Perfiles obtenidos por HPLC de los extractos realizados con CO₂ puro.

Exp.		Áreas relativas (%)				
		230nm	280nm	440nm	598nm	Total
11	S1	14,13	21,03	64,74	0,10	100
	S2	41,73	27,31	30,87	0,09	100
	S3	60,13	30,68	8,80	0,39	100
12	S1	16,73	15,48	67,66	0,12	100
	S2	41,43	29,57	28,76	0,23	100
	S3	70,79	26,70	2,33	0,18	100
13	S1	19,79	13,32	66,49	0,40	100
	S2	43,87	24,27	31,71	0,15	100
	S3	53,58	28,84	17,53	0,06	100
14	S1	31,46	25,72	42,23	0,58	100
	S2	19,40	16,75	63,38	0,47	100
	S3	20,46	16,67	62,70	0,17	100
15	S1	29,97	13,42	55,38	1,23	100
	S2	35,05	24,98	39,90	0,07	100
	S3	46,11	26,40	27,21	0,28	100
16	S1	35,84	24,58	38,15	1,43	100
	S2	42,58	25,71	31,49	0,23	100
	S3	41,56	27,08	31,25	0,11	100
17	S1	52,83	31,90	14,61	0,66	100
	S2	22,43	17,24	60,02	0,30	100
18	S1	43,84	25,72	30,14	0,30	100
	S2	44,12	28,49	27,22	0,17	100
	S3	43,70	25,44	30,53	0,33	100
19	S1	18,24	18,54	63,02	0,20	100
	S2	50,79	32,15	16,57	0,48	100
	S3	72,92	22,79	3,99	0,30	100
20	S1	27,84	20,30	49,28	2,58	100
	S2	16,28	16,11	67,26	0,35	100
	S3	47,64	28,78	23,47	0,11	100

En la Fig. III-17 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para la muestra 2.S1. La información obtenida de los principales picos se muestra en la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida..**

Teniendo en cuenta los espectros de UV-Vis, los picos que aparecen a 10,3, 12,2, 12,7, 13,1, 14,9, 15,6 y 16,2 minutos, picos 1, 2, 3, 4, 8 y 9, respectivamente, podrían corresponder a carotenoides (³⁹Jeffrey, Mantoura y col. 1997).

Tabla III-9.- Principales compuestos identificados con LC-MS y LC-MS/MS en las fracciones obtenidas en la extracción con fluidos supercríticos (220 bar y 55°C) de *Spirulina platensis*

t _R (min)	Max UV (nm)	M+H	Fragmentos importantes	Nombre	Número de pico
10,3	410, 455, 480	740	355, 371	Sifoneina	1
12,2	420, 452, 475	569	445, 429	Zeaxantina	2
12,7	420, 440, 470	751	589, 733	Fucósido de mixoxantofila	3
13,1	475			Astaxantina	4
13,7	415, 445, 470	536	519, 237, 503,	Carotenoides no identificados	9
14,9	460	589	311, 371, 571		9
15,6	460, 500	591	313, 335, 573		9
16,2		593	313, 337, 575		9
17,0	345, 390, 430	887	869, 609, 591	O-alomero de feofitina	5
18,2	345, 390, 430	893		Clorofila a	7
26,2 ^a	409, 507, 599	871	593	Feofitina a	6
30,8	420, 448, 478	537		β-caroteno	8
31,0 ^a	411, 525, 598	813		Pirofeofitina a	6

^aCompuestos hallados únicamente en el separador 2

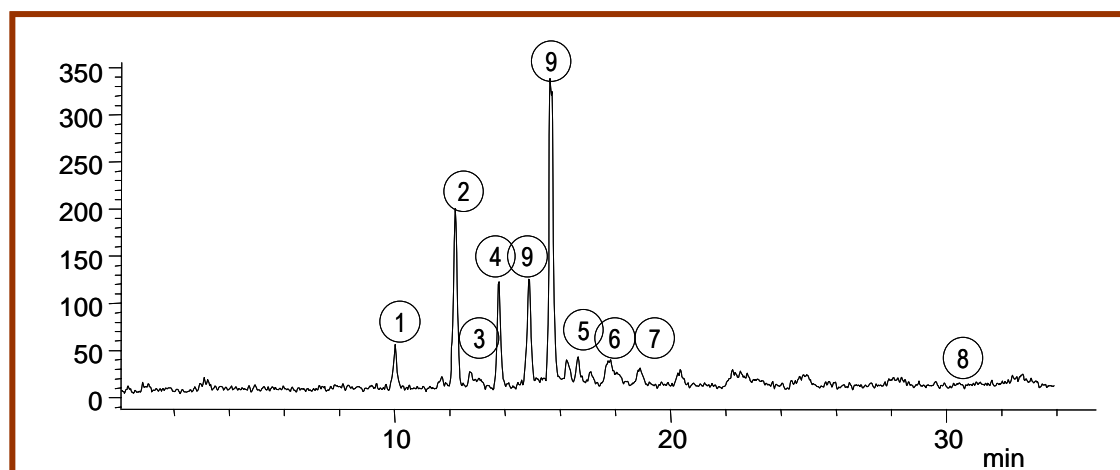


Fig. III-17.- Cromatograma obtenido con LC-APCI-MS del experimento 2, separador 1. Compuestos identificados: 1, Sifoneina; 2, Zeaxantina; 3, Mixoxantofila; 4, Astaxantina; 5, O-alomero de feofitina; 6, producto de degradación de Clorofila a; 7, Clorofila a; 8, β-caroteno y, 9, carotenoides sin identificar.

El espectro UV del pico de 10,3 min (máximos a 410, 455, 480 y relación III/II =0,76) corresponde a un carotenoide cetónico con un anillo β terminal. La señal de 371 m/z podría corresponder a la mitad de la molécula (M+H/2z), siendo el peso molecular igual a 742; la señal de 355 m/z podría corresponder a la pérdida de un hidroxilo. Con estos datos se puede concluir tentativamente que se trata del carotenoide sifoneina, cuya presencia ha sido previamente descrita en microalgas (⁴⁰Cohen 1999).

El pico que aparece a un tiempo de retención de 12,2 min podría corresponder a zeaxantina, dado que presenta máximos de absorción a 420, 452 y 475 nm y una relación III/II de 0,90, lo que concuerda con los espectros hallados por otros investigadores para este compuesto (⁴⁰Cohen 1999; ⁴¹Van den Hoek, Mann *y col.* 1995). El siguiente pico (12,7 min) presenta máximos de absorción a 420, 440 y 470 nm y señales m/z de 751, 733 y 589 m/z, ambas han sido descritas como fucósido de mixoxantofila (⁴²Hertzberg & Liaaen-Jensen 1969), un carotenoide ya descrito en algas del grupo de las cianobacterias (⁴¹Van den Hoek, Mann *y col.* 1995). El compuesto que eluye a 13,1 minutos presenta un espectro con un solo máximo a 475 nm, que es típico de dos carotenoides, astaxantina y cantaxantina, pero tan sólo la astaxantina ha sido descrita en *Spirulina platensis*. No ha sido posible realizar una identificación de los picos con tiempos de retención 14,9, 15,6 y 16,2 min, aunque sus espectros de absorción corresponden a espectros típicos de carotenoides.

Los compuestos con tiempos de retención entre 16 y 20 minutos fueron identificados como clorofila a y sus productos de degradación, como por ejemplo feoforbido a, feofitina a y pirofeofitina a, basándonos en sus espectros de absorción (³⁹Jeffrey, Mantoura *y col.* 1997). La presencia de estos productos de degradación puede deberse a reacciones de alomerización, epimerización, demetilación o feofitinización y ha sido descrita previamente en microalgas (⁴³Higashi-Okai, Otani *y col.* 1998). Los picos encontrados a 17,0 y 18,2 min presentan idénticos máximos de absorción pero las señales obtenidas en MS permitieron asignar la clorofila a al minuto 18,2 ($M+H^+ = 983,5$ m/z) y el pico del minuto 17 como o-alómero de feofitina debido a su patrón de fragmentación, 887, 869 y 609 m/z, (⁴⁴Chen, Bianchi *y col.* 2003). La posibilidad que ofrece la trampa iónica de llevar a cabo una determinación mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite la identificación inequívoca de iones moleculares; un ejemplo del potencial de esta técnica es la identificación del o-alómero de feofitina que se presenta en la Fig. III-18, donde se muestra el análisis completo de MS/MS, así como la segunda fragmentación de los iones 887,5 y 1796,5 m/z.

Además de los compuestos arriba mencionados, en el separador 2 se identificaron otros compuestos con tiempos de retención de 26,2 y 31,0 min con máximos de absorción de 409, 507 y 599 nm y 411, 525 y 598 nm respectivamente; esos datos junto con los iones encontrados en los espectros de masas permiten identificarlos como feofitina a y pirofeofitina a (⁴⁴Chen, Bianchi *y col.* 2003).

La presencia de productos de degradación de clorofilas puede atribuirse al empleo de etanol como disolvente de extracción y la temperatura empleada, que favorecen el tipo de reacciones anteriormente mencionadas. Por otro lado, no existen evidencias que demuestren que los cambios estructurales que se producen en la clorofila-a producen una degradación de sus propiedades funcionales, al contrario, los derivados formados, fundamentalmente feofitinas, pueden conservar o incluso mejorar estas propiedades (⁴¹Van den Hoek, Mann *y col.* 1995).

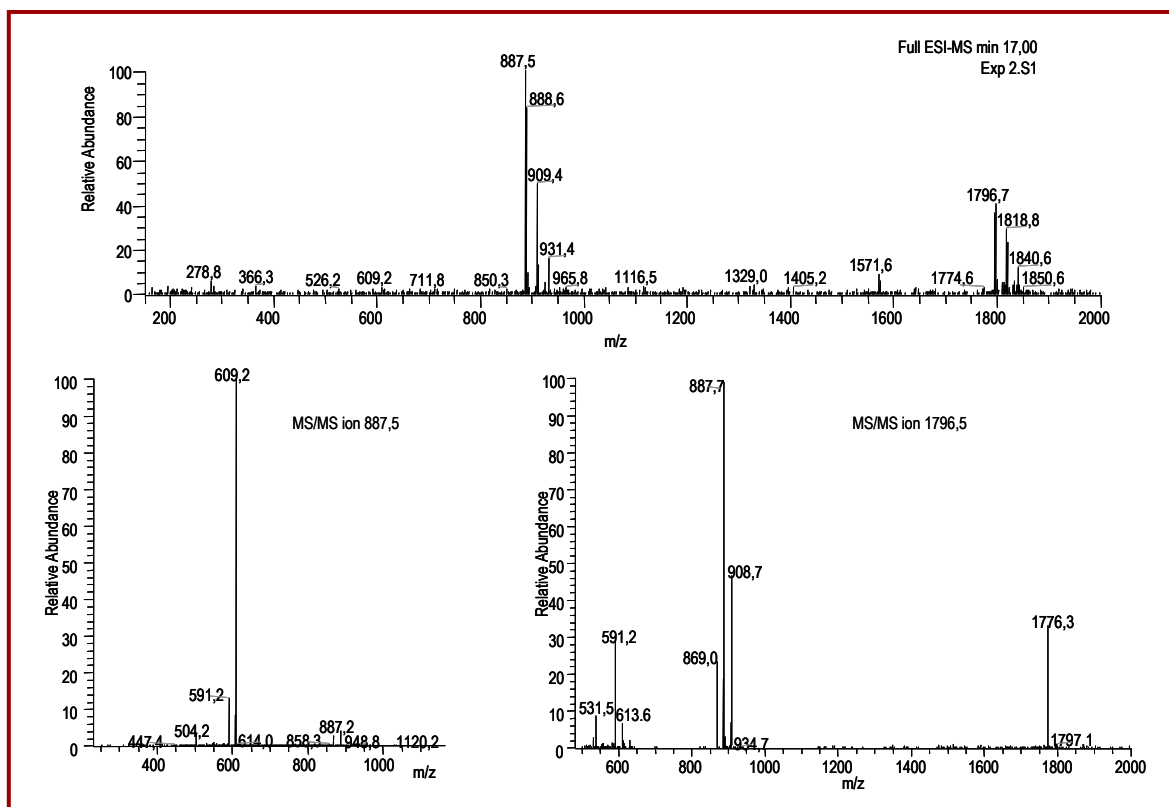


Fig. III-18.- Espectro de MS obtenido en el minuto 17 en el experimento 2, separador 1 (sup.) junto con los espectros de MS/MS obtenidos al fragmentar los iones de 887,5 m/z (inf. izq.) y 1796,5 m/z (inf. dch.)

Aunque la presencia de compuestos con máximos de absorción entre 230 y 280 se detectó en algunos extractos de *Spirulina*, su identificación no pudo ser confirmada por LC-MS con ninguna de las dos interfases utilizadas. Sin duda, la presencia de este tipo de estructuras fenólicas debe ser confirmada ya que no se han descrito anteriormente en cianofitas.

4. CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto se puede concluir:

- ✖ Los mejores rendimientos de extracción se consiguieron en condiciones de presión bajas (78 bar) y temperaturas intermedias (55 °C) empleando como agente extractante CO₂ con un 10% de etanol como modificador. En general la mayor cantidad de extracto se obtuvo en el segundo separador de los tres que consta la planta piloto de extracción supercrítica empleada.
- ✖ Como característica funcional de los extractos se evaluó su capacidad antioxidante medida por dos métodos: autooxidación de ácido linoleico y captación de radicales DPPH, obteniéndose los mejores resultados a temperaturas medias y presiones medias y altas.
- ✖ Asimismo, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos obteniéndose los mejores resultados para inhibir el crecimiento de *C. albicans*. En líneas generales los extractos no presentaron grandes diferencias en cuanto a su actividad antimicrobiana, lo que se confirmó mediante el análisis de su perfil lipídico.

- ✱ La cromatografía de gases reveló que no existían diferencias cualitativas para la extracción de ácidos grasos a partir de *Spirulina platensis*, aunque sí se pudieron apreciar pequeñas diferencias cuantitativas dependiendo del separador, precipitando en mayor cantidad los ácidos grasos de cadena medias-largas en el primer separador.
- ✱ La TLC reveló que la mayoría de los carotenoides obtenidos presentaban polaridades intermedias entre la luteína y el β -caroteno y puso de manifiesto una mayor presencia de clorofilas en las extracciones realizadas con etanol, lo que se confirma con los resultados obtenidos en HPLC. La tinción con DPPH permitió conocer qué familias de compuestos presentaban una mayor actividad antioxidante.
- ✱ El análisis mediante HPLC-DAD permitió una clasificación de los compuestos extraídos basada en sus espectros de absorción UV-Visible, perteneciendo la mayor parte de ellos a la familia de los carotenoides. Este análisis evidenció que el empleo de modificador favorece la extracción de clorofilas y que éstas precipitan en su mayor parte en el primer separador. También se pudo establecer un patrón en la composición porcentual por familias y los extractos que mejores actividades antioxidantes produjeron. Además, el empleo de HPLC-MS/MS permitió una identificación inequívoca de la mayoría de los compuestos detectados.

5. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Dillon, J.C., Phuc, A.P. y col. (1995). "Nutritional value of the alga *Spirulina*". World Rev. Nutr. Diet 77: 32-46.
- 2.- Mittal, A., Kumar, A. y col. (1998). "Modulatory influence of *Spirulina fusiformis* on 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene induced Papillomagenesis in the skin mice". Pharmaceutical Biology 36: 341-346.
- 3.- Subhashini, J., S.V.K., M. y col. (2004). "Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562". Biochemical Pharmacology 68: 453-462.
- 4.- Bhat, V.B. & Madyastha, K.M. (2000). "C-Phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro". Biochemical and Biophysical Research Communications 275: 20-25.
- 5.- Miranda, M.S., Cintra, R.G. y col. (1998). "Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*". Journal of medical and biological research 31: 1075-1079.
- 6.- Piñero Estrada, J.E., Bermejo Bescós, P. y col. (2001). "Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract". Il Farmaco 56: 497-500.
- 7.- Simo, C., Herrero, M. y col. (2005). "Characterization of proteins from *Spirulina platensis* microalga using capillary electrophoresis-ion trap-mass spectrometry and capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry". Electrophoresis 26(13): 2674-2683.
- 8.- King, M.B. & Bott, T.R. (1993). Extraction of natural products using near-critical solvents. Glasgow, Blackie Academic & Professional.
- 9.- Tena, M.T., Valcarcel, M. y col. (1997). "Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication". Analytical Chemistry 69(3): 521-526.
- 10.- Simo, C., Ibañez, E. y col. (2002). "Analysis of Antioxidants from Orange Juice Obtained by Countercurrent Supercritical Fluid Extraction, Using Micellar Electrokinetic Chromatography and Reverse-Phase Liquid". Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(23): 6648-6652.
- 11.- Sherma, J. (2000). "Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis". Journal of Chromatography A 880(1-2): 129-147.

- 12.- Soler Rivas, C., Espín, J.C. y col. (2000). "An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs". Phytochemical analysis 11: 330-338.
- 13.- Santoyo, S., Cavero, S. y col. (2005). "Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction". Journal of Food Protection 68(4): 790-795.
- 14.- Santoyo, S., Cavero, S. y col. (2006). "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from Origanum vulgare L.: Determination of optimal extraction parameters". Journal of Food Protection 69(2): 369-375.
- 15.- Mendes, R.L., Nobre, B.P. y col. (2003). "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae". Inorganica Chimica Acta 356: 328-334.
- 16.- Benkendorff, K., Davis, A.R. y col. (2005). "Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties". Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 316(1): 29-44.
- 17.- Kabara, J.J., Vrible, R. y col. (1977). "Antimicrobial lipids: Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides". Lipids 12(9): 753-759.
- 18.- Couladis, M., Chinou, I.B. y col. (2002). "Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Ballota pseudodictamnus L. Benth". Phytotherapy Research 16(8): 723-726.
- 19.- Palic, R., Stojanovic, G. y col. (2002). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of the oriental tobacco, Prilep". Flavour and Fragrance Journal 17(5): 323-326.
- 20.- Santoyo, S., Lloria, R. y col. (2006). "Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from Laurus nobilis L. Chemical and functional characterization". European Food Research and Technology 222(5-6): 565-571.
- 21.- Seidel, V. & Taylor, P.W. (2004). "In vitro activity of extracts and constituents of Pelagonium against rapidly growing mycobacteria". International Journal of Antimicrobial Agents 23(6): 613-619.
- 22.- Whitfield, F.B., Helidoniotis, F. y col. (1999). "Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia". Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 2367-2373.
- 23.- Barreto, M. & Meyer, J.J.M. (2006). "Isolation and antimicrobial activity of a lanosol derivative from *Osmundaria serrata* (Rhodophyta) and a visual". South African Journal of Botany 72(4): 521-528.
- 24.- Bernart, M.W. & Gerwick, W.H. (1994). "Eicosanoids from the tropical red alga *Murrayella pericladus*". Phytochemistry 36(5): 1233-1240.
- 25.- Dembitsky, V.M., Rezanka, T. y col. (2003). "Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae". Chemistry and Physics of Lipids 123(2): 117-155.
- 26.- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y col. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 28: 25-30.
- 27.- Makris, D. & Rossiter, J. (2001). "Comparison of quercetin and a non-orthohydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions". Journal of agricultural and Food Chemistry 49: 3370-3377.
- 28.- NCCLS (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M100-S9.
- 29.- Quach, H.T., Steeper, R.L. y col. (2004). "Separation of Plant Pigments by Thin Layer Chromatography". Journal of Chemical Education 81: 385-387.
- 30.- Vidussi, F., Claustre, H. y col. (1996). "A rapid HPLC method for the determination of phytoplankton pigments in natural waters including the separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein". Journal of Plankton Research 18: 2377-2382.
- 31.- Borowitzka, M.A. (1995). "Microalgae as sources of pharmaceutical and other biologically active compounds". Journal of Applied Phycology 7: 3-15.
- 32.- Kreitlow, S., Mundt, S. y col. (1999). "Cyanobacteria: a potential source of new biologically active substances". Journal of Biotechnology 70: 61-63.
- 33.- Ozdemir, G., Karabay, N.U. y col. (2004). "Antibacterial activity of volatile components and various extracts of *Spirulina platensis*". Phytotherapy Research 18: 754-757.
- 34.- de Mule, M.C.Z., de Caire, G.Z. y col. (1996). "Bioactive substances from *Spirulina platensis* (Cyanobacteria)". Phyton 58: 93-96.
- 35.- Abalde, J., Cid, A. y col. (1995). Microalgas: cultivo y aplicaciones. A Coruña, Servicio de publicaciones de la Universidad da Coruña.
- 36.- Ouattara, B., Simard, R.E. y col. (1997). "Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms". International Journal of Food Microbiology 37(2-3): 155-162.

- 37.- **Sun, Y., Dwyer-Nield, L.D. y col.** (2003). "Responses of tumorigenic and non-tumorigenic mouse lung epithelial cell lines to electrophilic metabolites of the tumor promoter butylated hydroxytoluene". Chemico-Biological Interactions 145: 41-51.
- 38.- **Tsao, R. & Yang, R.** (2003). "Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography". Journal of Chromatography A 1018: 29-40.
- 39.- **Jeffrey, S.W., Mantoura, F.F.C. y col.** (1997). Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods. Paris, UNESCO Publishing.
- 40.- **Cohen, Z.** (1999). Chemicals from microalgae. London, Taylor & Francis.
- 41.- **Van den Hoek, C., Mann, D.G. y col.** (1995). Algae. An introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press.
- 42.- **Hertzberg, S. & Liaaen-Jensen, S.** (1969). "The structure of myxoxanthophyll (The carotenoids of blue-green algae Part IV)". Phytochemistry 8: 1259-1280.
- 43.- **Higashi-Okai, K., Otani, S. y col.** (1998). "Potent suppressive activity of pheophytin a and b from the non-polyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin". Cancer Letters 129: 223-227.
- 44.- **Chen, N., Bianchi, T.S. y col.** (2003). "Novel decomposition products of chlorophyll-a in continental shelf (Louisiana shelf) sediments: Formation and transformation of carotenol chlorin esters". Geochimica et Cosmochimica Acta 67(11): 2027-242.

IV. Capítulo IV: Obtención y caracterización de
extractos supercríticos de *Dunaliella salina* con
potencial actividad antioxidante

1. Introducción.....	93
1.1. Objetivos y plan de trabajo	95
2. Materiales y métodos.....	96
2.1. Muestras y reactivos	96
2.2. Actividad antioxidante (TEAC).....	97
2.3. Extracciones con CO ₂	98
2.4. Condiciones cromatográficas	100
2.5. Análisis estadístico	101
3. Resultados y discusión	101
3.1. Optimización de las condiciones de extracción.....	101
3.2. Actividad antioxidante.....	103
4. Conclusiones	106
5. Bibliografía.....	107

1. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se plantea el empleo de SFE para la obtención de extractos antioxidantes de *Dunaliella salina* y el estudio de la relación de su actividad antioxidante con la composición en los diferentes isómeros del β -caroteno.

Los carotenoides son muy utilizados como pigmentos y antioxidantes en diversos sectores industriales, principalmente en la industria farmacéutica, nutracéutica y alimentaria. Las legislaciones internacionales sobre aditivos alimentarios son cada vez más exigentes y han influido positivamente en la potenciación de esta clase de pigmentos. Este hecho ha conducido a su vez a estimular la producción de carotenoides procedentes de microalgas para su uso como colorantes y aditivos naturales.

El empleo de antioxidantes en la industria alimentaria aumenta con el paso de los años, dado su marcado efecto de retraso de peroxidación lipídica (¹Halliwell 1999; ²Halliwell, Aeschbach y col. 1995) y más específicamente por sus efectos beneficiosos para la salud (³Madhavi, Despande y col. 1996). Los antioxidantes poseen efectos protectores frente a la patogénesis producida por los radicales libres (⁴Cao & Prior 1998), por ejemplo regulando la expresión de genes que codifican enzimas como la superóxido-dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y lípido peroxidasa (⁵Aruoma 1994; ⁶McCord 1994).

Pero además, diversos carotenoides presentan propiedades beneficiosas para la salud humana, lo que les sitúa como potenciales ingredientes alimentarios funcionales. Por ejemplo, se han descrito propiedades preventivas de la luteína sobre el cáncer (⁷Alves-Rodrigues & Shao 2004; ⁸Le Marchand, Hankin y col. 1993), así como sobre los daños retinales relacionados con el envejecimiento (⁹Desmettre & Lecerf 2005; ¹⁰Koh, Murray y col. 2004). El β -caroteno no es una excepción, ya que además de ser precursor directo de la Vitamina A, ha sido asociado con importantes propiedades antioxidantes (¹¹Burri 1997), al igual que sucede con otros compuestos carotenoides (¹²Goodwin 1984; ¹³Krinsky 2001; ¹⁴Opara & Rockway 2006; ¹⁵Palace, Khaper y col. 1999; ¹⁶Sharoni, Danilenko y col. 2004; ¹⁷Voutilainen, Nurmi y col. 2006). Diversos estudios epidemiológicos muestran evidencias de que la actividad antioxidante asociada al β -caroteno puede prevenir el cáncer en diversos órganos como pulmones, estómago, cérvix, páncreas, colon, recto, próstata y ovarios (¹¹Burri 1997; ¹⁸Chidambara Murthy, Vanitha y col. 2005; ¹⁹Poppel & Goldbohm 1995; ²⁰Tapiero, Townsend y col. 2004). No obstante, al igual que ocurre con la mayoría de los compuestos tratados en la presente tesis, no deben olvidarse sus potenciales efectos adversos relacionados, principalmente, con la dosis empleada (²¹Bast & Haenen 2002; ²²Olmedilla, Granado y col. 2001; ²³Palozza, Serini y col. 2003; ²⁴Paolini, Abdel-Rahman y col. 2003; ²⁵Wang & Russell 1999).

Las microalgas son consideradas hoy en día como un gran recurso natural y son cada vez más estudiadas para su explotación industrial con diversos fines (²⁶Cohen 1999; ²⁷Olaizola 2003; ²⁸Spolaore, Joannis-Cassan y col. 2006). Una de las características que hace tan atractivas a las microalgas es la rapidez con la que éstas se desarrollan. Además, este crecimiento requiere tan solo la aportación de nutrientes inorgánicos y luz solar (²⁹Richmond 1986). En la actualidad, la microalga dinoflagelada *Dunaliella salina* es una de las microalgas que más se cultivan industrialmente. Esto se

debe, principalmente, a las características particulares que posee y que permiten su desarrollo en medios altamente halófilos que no están al alcance de la mayoría de microorganismos similares.

Además, en estas condiciones de crecimiento de alto estrés, *Dunaliella* es capaz de almacenar gran cantidad de carotenoides, principalmente β -caroteno, llegando a suponer hasta un 14 % de su peso seco (³⁰Vorst 1995). Esta microalga es una de las fuentes naturales mas importantes de este compuesto, incluyendo grandes cantidades del isómero 9-cis (³¹Borowitzka 1999; ³²Oren 2005).

Este isómero ha demostrado poseer una mayor actividad antioxidante que su isómero trans (³³Levin & Mokady 1994), aunque por otro lado este último presenta una mayor absorción intestinal que el 9-cis (³⁴Stahl, Schwarz *y col.* 1993)

Una de las adaptaciones evolutivas que ostenta *Dunaliella*, que supone una ventaja a la hora de pretender extraer compuestos de su citoplasma, es la ausencia de una pared celular rígida de polisacáridos como otras muchas microalgas. En su lugar, la célula posee una membrana plasmática bastante flexible cubierta por un recubrimiento mucoso(³⁰Vorst 1995). Esto permite que la célula pueda adaptarse a rápidos cambios en la salinidad del medio, pudiendo variar su volumen en gran medida sin sufrir daños. Este hecho va a jugar un papel ventajoso a la hora de la extracción de compuestos antioxidantes de *Dunaliella salina*, ya que, en principio, la ausencia de pared celular debe facilitar el intercambio de materia durante la extracción (³²Oren 2005).

En cuanto al análisis de carotenoides, se han desarrollado varios métodos basados en el empleo de HPLC (³⁵Rodriguez-Bernaldo de Quiros & Costa 2006; ³⁶Schoefs 2002; ³⁷Su, Rowley *y col.* 2002; ³⁸Weber, Anke *y col.* 2007). La mayoría de estos métodos se basan en el empleo de columnas C₁₈ y permiten el análisis de varios compuestos de la familia de los carotenoides, aunque no es posible llevar a cabo el análisis conformacional de estos compuestos (³⁹Schieber & Carle 2005). La introducción de columnas basadas en fases C₃₀, específicamente desarrolladas para este fin a mediados de los noventa por Sander *y col.* (⁴⁰Sander, Sharpless *y col.* 1994), ha permitido el análisis de diferentes isómeros de carotenoides, así como la separación de compuestos muy similares (³⁹Schieber & Carle 2005). Este tipo de columnas se ha utilizado para la separación de los diferentes isómeros del β -caroteno (⁴¹Strohschein, Pursch *y col.* 1997), incluso el procedente de *Dunaliella* (⁴²Bononi, Commissati *y col.* 2002). Breithaupt (⁴³Breithaupt 2004) desarrollo un método basado en el empleo de este tipo de columnas, mediante el cual no sólo logró la separación e identificación de diferentes isómeros del β -caroteno (13-cis- β -caroteno, 15-cis- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno y all-trans- β -caroteno, Fig. IV-1) sino también de otros carotenoides.

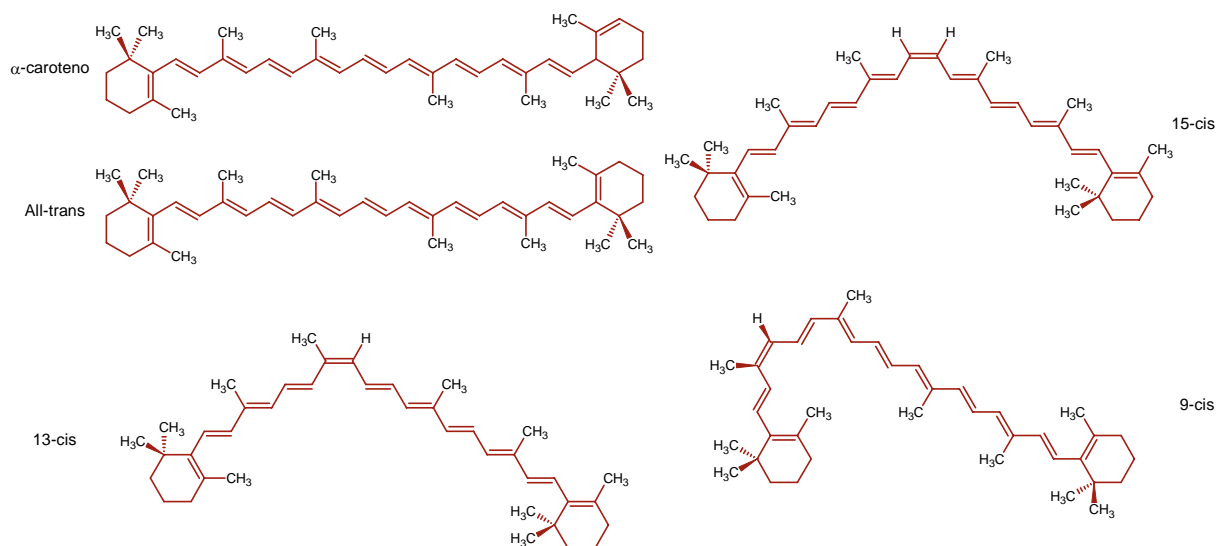


Fig. IV-1 .- Estructuras químicas de los principales carotenoides estudiados en el presente capítulo: α -caroteno, all-trans- β -caroteno, 15-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno y 9-cis- β -caroteno

En el presente trabajo, se propone el empleo de la extracción con fluidos supercríticos (SFE) para obtener compuestos con actividad antioxidante procedentes de la microalga *Dunaliella salina*. La aplicación de SFE para la obtención de extractos de microalgas ricos en carotenoides no es nueva (⁴⁴Lesellier, Gurdale *y col.* 1999; ⁴⁵Mendes, Fernandes *y col.* 1995; ⁴⁶Mendes, Nobre *y col.* 1999) si bien, tan sólo un trabajo se ha centrado en la extracción selectiva mediante SFE de isómeros conformacionales de carotenoides (⁴⁷Gamlieli-Bonshtein, Korin *y col.* 2002). La hipótesis de trabajo de Gamlieli-Bonshtein *y col.* se basa en las diferencias de solubilidad existentes entre los isómeros 9-cis y all-trans en CO_2 . De hecho, el isómero all-trans es prácticamente insoluble en aceites y fácilmente cristalizado a bajas temperaturas, mientras que el 9-cis es mucho más soluble en disolventes lipofílicos, de “cristalización amorfa” y con alto punto fusión (⁴⁸Ben-Amotz, Shaish *y col.* 1989). Estas propiedades sugieren una mayor solubilidad del isómero 9-cis en CO_2 sub y supercrítico.

En este Capítulo, se propone llevar a cabo la optimización de las condiciones de extracción de compuestos antioxidantes procedentes de *Dunaliella salina* mediante SFE empleando un diseño experimental. Esta estrategia, como ya se mostró en el Capítulo II de la presente Memoria, ha sido muy útil para optimizar procesos de extracción mediante SFE. Además, al tener como objetivo la extracción de compuestos con actividad antioxidante de *Dunaliella salina*, no se descarta la extracción de distintos tipos de compuestos (carotenoides o no) que pudieran poseer actividad antioxidante. Para ello se llevó a cabo un estudio sobre las posibles correlaciones existentes entre la actividad antioxidante de los extractos y su composición química.

1.1. Objetivos y plan de trabajo

En este trabajo se estudió la microalga *Dunaliella salina* como fuente natural de antioxidantes obtenidos mediante SFE. Para ello se emplearon diferentes condiciones de extracción: temperaturas (9,8-45,2 °C) y presiones de extracción (182-438 atm). Del mismo modo, se determinó la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante ensayos *in vitro*. Por lo tanto, el objetivo principal

del presente trabajo fue la optimización de las condiciones de extracción mediante SFE para la extracción de compuestos con actividad antioxidante de *Dunaliella salina*. Se estableció como segundo objetivo determinar las posibles relaciones existentes entre la actividad antioxidante de los extractos y su composición química, fundamentalmente en cuanto a su contenido en carotenoides.

Para llevar a la práctica los objetivos propuestos, se diseñó un plan de trabajo que consistió en (véase Fig. IV-2):

- ✖ Desarrollo de un diseño experimental para la obtención de información relativa al rendimiento y actividad antioxidante de los extractos de *Dunaliella salina* en un amplio intervalo de condiciones de extracción.
- ✖ Selección de las condiciones óptimas de extracción, en cuanto a presión y temperatura de extracción empleados, y desarrollo de una metodología de análisis por HPLC.
- ✖ Análisis de la actividad antioxidante y de la cuantificación de los principales carotenoides encontrados en los extractos.
- ✖ Estudio de posibles correlaciones entre las condiciones de extracción, la composición química de los extractos y el rendimiento y la actividad antioxidante. Modelado matemático de dichas correlaciones.

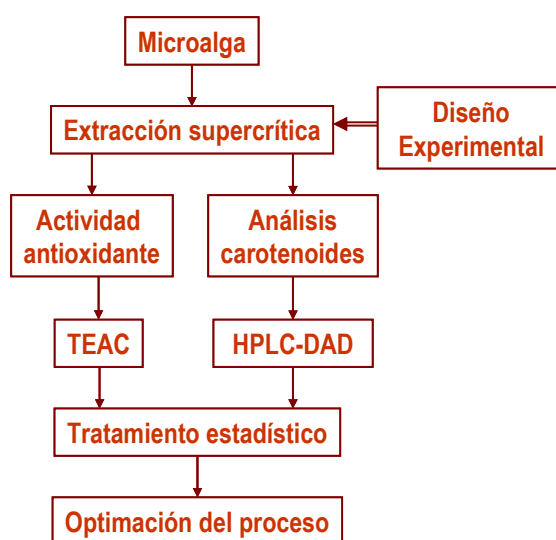


Fig. IV-2.- Esquema de trabajo empleado para la optimización de la extracción

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

Las muestras de la microalga *Dunaliella salina* consistieron en microalga liofilizada proporcionada por Nature Beta Technologies Ltd. (Jerusalem, Israel) que se mantuvieron almacenadas a temperatura ambiente en ausencia de luz y oxígeno.

El CO₂, calidad N48, para realizar las extracciones fue suministrado por AL Air liquide España (Madrid).

ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonato sal diamónica) y el persulfato de potasio fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) y la mezcla de isómeros de carotenoides por Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). El trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) y all-trans- β -caroteno por Fluka Chemie AG (Buchs, Suiza). Todos los disolventes empleados de Labscan (Dublín, Irlanda) a excepción del etanol absoluto de Panreac Química (Barcelona). El agua miliQ fue obtenida mediante un equipo de purificación Millipore (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

2.2. Actividad antioxidante (TEAC)

El método empleado para determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con CO₂ en este trabajo ha sido el método de equivalente de trolox, denominado comúnmente TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (⁴⁹Re, Pellegrini *y col.* 1999). Este método, basado en la generación de radicales de ABTS, fue desarrollado por primera vez por Miller *y col.* (⁵⁰Miller, Rice-Evans *y col.* 1993) y aplicado con éxito a la determinación de la actividad antioxidante de carotenoides (⁵¹Miller, Sampson *y col.* 1996).

La obtención de radicales se lleva a cabo de manera previa al propio ensayo, mediante la oxidación del ABTS con persulfato potásico, obteniendo un producto coloreado que presenta un máximo de absorción a 734 nm, ABTS^{•+}. Posteriormente, la adición de antioxidantes durante el ensayo reduce los radicales de ABTS^{•+} generados con K₂SO₅, produciendo simultáneamente una reducción en su color y la consiguiente reducción en los valores de absorbancia presentados a 734 nm.

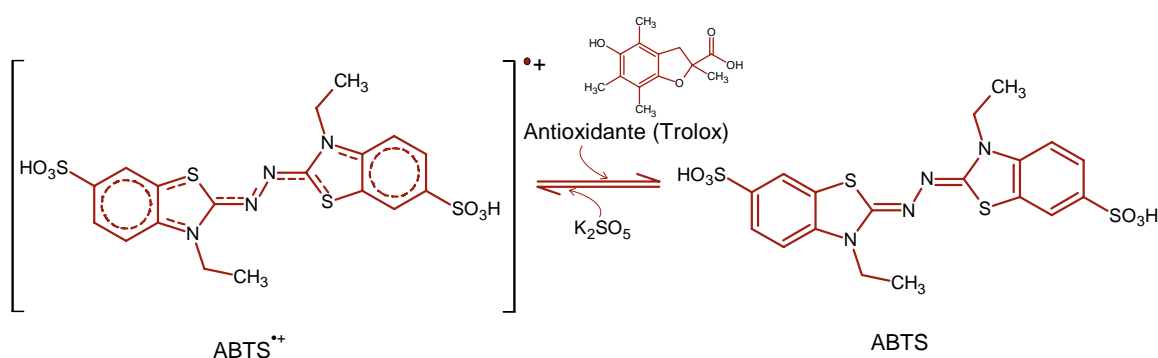


Fig. IV-3.- Reacción producida en el ensayo de actividad antioxidante empleado para medir la actividad de los extractos de Dunaliella.

El estándar de referencia que se emplea en este método es el Trolox. Esta sustancia es un análogo sintético de la vitamina E. El valor TEAC, que ilustrara la actividad antioxidante que posee la muestra, se define como la concentración o cantidad de antioxidante en la muestra, capaz de reducir la absorbancia producida por los radicales de ABTS en la misma proporción que lo hace una concentración 1mM de Trolox. El valor TEAC se mide en mM Trolox/g extracto. Es decir, cuanto mayor es el valor TEAC, mayor sería la actividad antioxidante.

En la práctica, se emplearon diferentes concentraciones de extracto, con el fin de asegurar una respuesta lineal frente al radical oxidante. Gracias a la facilidad operacional y a la simplicidad que supone la aplicación de este método, se ha empleado en una gran variedad de compuestos y muestras alimentarias. Además, presenta como ventaja adicional la posibilidad de ser utilizado para determinar actividades antioxidantes de muestras de diferente naturaleza: hidrofílicas, lipofílicas, extractos, compuestos puros, etc.

Entre otras muestras alimentarias, se ha determinado la actividad antioxidante como valores TEAC de frutas, cereales (⁵²Spigno, Tramelli *y col.* 2007; ⁵³Stratil, Klejdus *y col.* 2007), soja (⁵⁴Long, Kwee *y col.* 2000), vinos (⁵⁵Paixao, Perestrelo *y col.* 2007) o cerveza (⁵⁶Gasowski, Leontowicz *y col.* 2004). Sin embargo, hasta el momento, no se han publicado resultados referentes a la valoración de la actividad antioxidante mediante este método, de muestras procedentes de algas o microalgas, salvo los desarrollados en nuestro grupo de investigación (⁵⁷Herrero, Jaime *y col.* 2006).

En el método TEAC usado, el catión radical ABTS^{•+} se generó haciendo reaccionar una solución 7 mM de ABTS con una concentración 2,45 mM de persulfato potásico (concentraciones finales de reacción) durante 16 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz. Esta solución de radical ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta lograr un absorbancia en torno a 0,70 UA medida a 734 nm. Posteriormente, la reacción se inició mediante la adición de 10 µl de extracto de *Dunaliella* disuelto, a diferentes concentraciones, en diclorometano a 990 µl de la disolución diluida de ABTS^{•+}. La mezcla de reacción se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, tiempo tras el cual, se midió la absorbancia a 734 nm. El trolox se usó como patrón de referencia, y de esta forma, los resultados se pudieron expresar como Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (valor TEAC). Estos valores se obtuvieron a tres diferentes concentraciones diferentes, al menos, para cada uno de los extractos estudiados proporcionando una respuesta lineal. Además, todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

2.3. Extracciones con CO₂

Dada la escasa cantidad de *Dunaliella* disponible, las extracciones se realizaron en un equipo de escala analítica (Fig. IV-4) en lugar de la planta piloto empleada en capítulos anteriores.

Las principales diferencias del Suprex Prepmaster de Thar designs (Pittsburg, USA) respecto a la planta piloto empleada para las extracciones de *Spirulina* consisten en: una celda de extracción mucho menor (10 ml *vs* 280 ml) y una bomba de CO₂ de doble pistón (*vs* bomba de membrana). Como se puede ver en el esquema de la Fig. IV-4 este equipo de extracción no permite el fraccionamiento en cascada de los extractos, por tanto el resultado obtenido es siempre un único extracto. Los extractos son recogidos en un vial de vidrio colocado en un depósito diseñado en nuestro laboratorio (⁵⁸Ibañez, Oca *y col.* 1999) en el que se minimizan las pérdidas de solutos por el enfriado asociado al efecto Joule-Thompson debido a la propia expansión del CO₂.

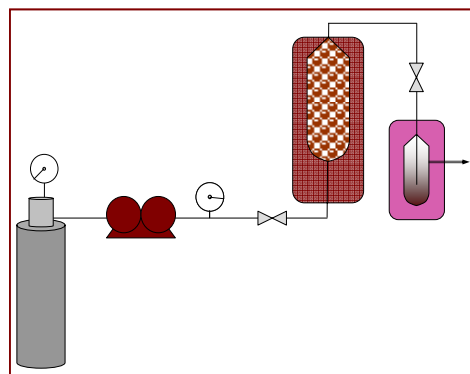


Fig. IV-4.- Equipo de extracción supercrítica de escala analítica Suprex-Prepmaster (Thar designs, Pittsburg USA) y esquema de funcionamiento

Para todas las extracciones se fijó la cantidad de muestra, 1 g de Dunaliella, y el tiempo de extracción, 100 minutos. Estos 100 minutos constaron de 10 minutos de extracción estática (en los que el CO₂ permaneció en contacto con la muestra, sin circulación), seguidos de 90 en régimen dinámico.

Las extracciones se realizaron siguiendo un diseño experimental Central Compuesto y Rotativo de superficie de respuesta considerando la presión y la temperatura como factores del diseño a dos niveles, es decir, 2². Éste constaba de 10 experimentos: 4 puntos del diseño factorial completo, 4 puntos “de estrella” (distancia axial $\alpha=1,414$) y dos puntos centrales. Los experimentos se realizaron en orden aleatorio.

Las condiciones del diseño experimental fueron seleccionadas con el objetivo de maximizar la densidad. Las presiones oscilaron entre 182,7 y 438,3 atm y la temperatura entre 9,8 y 45,2 °C, con ello se consiguieron densidades entre 0,85 y 1,03 g/ml. La mayoría de los experimentos fueron realizados en la zona líquida-subcrítica debido a las bajas temperaturas seleccionadas para evitar la degradación de los carotenoides (⁵⁹Cocero, González y col. 2000). Como variables respuesta del diseño experimental se seleccionaron el rendimiento de extracción (determinado como % de peso obtenido respecto al peso inicial) y la actividad antioxidante determinada mediante el análisis TEAC. La Tabla IV-1 muestra los niveles de los factores (codificados) que corresponden a la matriz experimental del diseño, así como, los valores físicos de los mismos. El modelo cuadrático propuesto para cada variable respuesta (Y_i) fue:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 T + \beta_{1,1} P^2 + \beta_{2,2} T^2 + \beta_{1,2} PT + \epsilon$$

Ecuación IV-1

Donde β_0 es el término independiente; β_1 y β_2 son los coeficientes lineales; β_{11} y β_{22} los coeficientes cuadráticos; β_{12} el coeficiente de la interacción; y ϵ es el error experimental. Los parametros del modelo fueron estimados empleando Regresión Lineal Múltiple (MLR) mediante el software Statgraphics Plus 5.1, el mismo software con el que se realizó el diseño experimental.

El efecto de cada término en el modelo y su significación estadística, se analizaron mediante un gráfico de Pareto estandarizado. Los términos que resultaron ser significativamente iguales a cero ($P>0,10$), fueron excluidos del modelo matemático y éste fue reajustado mediante MLR. El ajuste del modelo fue evaluado mediante el coeficiente de regresión (R^2) y la desviación estándar de los residuos (RSD) de la tabla ANOVA. Con ello se pudo obtener la superficie de respuesta, así como

las condiciones experimentales que maximizaban la variable respuesta: rendimiento o actividad antioxidante.

Tabla IV-1.- Diseño factorial empleado para la obtención de antioxidantes de *Dunaliella salina*.

	Niveles de los factores:				
Exp.	Valores codificados		Valores reales		Densidad CO ₂ g/L
	Presión	Temperatura	P (atm)	T (°C)	
1	0	0	310	27,5	962,4
2	0	0	310	27,5	962,4
3	1	1	400	40	956,8
4	1	-1	400	15	1035,7
5	-1	1	220	40	858,1
6	-1	-1	220	15	969,6
7 [◊]	1,414	0	437,3	27,5	1008,9
8 [◊]	-1,414	0	182,7	27,5	890,9
9 [◊]	0	1,414	310	45,2	896,2
10 [◊]	0	-1,414	310	9,8	1024,4

◊.- Puntos de estrella del diseño experimental

2.4. Condiciones cromatográficas

Todos los análisis de los extractos de *Dunaliella* se realizaron empleando HPLC-DAD según el método desarrollado por Breithaup (⁴³Breithaupt 2004) en un equipo Agilent 1100 acoplado a un detector de haz de diodos. Los cromatogramas fueron monitorizados empleando 450 nm como longitud de onda de detección (4nm como ancho de ventana y 550 nm como longitud de onda de referencia). La columna analítica empleada fue una YMC C30 (5 µm, 250×4,6 mm d.i.) suministrada por YMC (Schermbeck, Alemania). Las fases móviles empleadas fueron:

- ✖ A: metanol, agua y trietilamina, 90:10:0,1 v:v:v, y
- ✖ B: metil-tercbutil éter, metanol, agua y trietilamina 90:6:4:0,1; en este caso fue necesario el empleo de un embudo de decantación para eliminar el agua sobrante y evitar la formación de una segunda fase.

El gradiente empleado fue (min/%A): 0/93,5; 34/0; 38/93,5; 53/93,5. El caudal de fase móvil se mantuvo constante a 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 µl. Para la inyección todas las muestras se disolvieron en diclorometano a una concentración 5 mg/ml.

La identificación se realizó empleando un patrón compuesto por una mezcla de α y β -caroteno y por comparación de los tiempos de retención y máximos de absorción con datos previamente publicados (⁴²Bononi, Commissati y col. 2002; ⁴³Breithaupt 2004; ⁴¹Strohschein, Pursch y col. 1997). La cuantificación se llevó a cabo empleando un patrón externo de all-trans- β -caroteno de síntesis y

asumiendo el mismo factor de respuesta para todos los isómeros, dada la imposibilidad de encontrar muestras comerciales de los diferentes isómeros.

2.5. Análisis estadístico

Además del ajuste obtenido mediante regresión lineal múltiple (MLR) se realizó un análisis de componentes principales y un análisis clúster (de las variables estandarizadas), para examinar las relaciones entre las variables analizadas y estudiar la aparición de agrupamientos entre ellas, respectivamente. Para este fin se empleó el paquete informático Statistica (v7.1, Statsoft Inc., Tulsa, EEUU).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización de las condiciones de extracción

Los resultados obtenidos en términos de rendimiento de extracción (% en peso de extracto respecto al peso inicial de alga) y de actividad antioxidante (expresada como valores TEAC mmol Equivalentes de Trolox/g extracto) se pueden ver en la Tabla IV-2. Los mejores resultados, en términos de rendimiento de extracción, se obtuvieron trabajando con las densidades más altas (experimentos 4 y 7), es decir, empleando altas presiones y temperaturas bajas, con valores superiores al 6 %. Esto puede ser debido a que la extracción de carotenoides está favorecida por el empleo de elevadas densidades de CO₂ cuando se trabaja en intervalos subcríticos (⁶⁰Favati, King *y col.* 1998; ⁶¹Ibañez, López-Sebastián *y col.* 1998). A pesar de que en el rendimiento total de extracción se debe tener en cuenta la presencia de otros compuestos, parece claro que los carotenoides tienen una relación directa con el total de material extraído.

Tabla IV-2.- Rendimientos y actividades antioxidantes obtenidos en los extractos SFE de *Dunaliella salina*

Exp.	P (atm)	T (°C)	Densidad de CO ₂ g/L	Rendimiento %	TEAC [‡]
1	310	27,5	962,4	4,41	0,181
2	310	27,5	962,4	4,42	0,169
3	400	40	956,8	5,48	0,176
4	400	15	1035,7	6,08	0,268
5	220	40	858,1	4,12	0,093
6	220	15	969,6	4,31	0,115
7	437,3	27,5	1008,9	6,58	0,452
8	182,7	27,5	890,9	4,02	0,157
9	310	45,2	896,2	4,38	0,253
10	310	9,8	1024,4	4,52	0,259

‡Actividad antioxidante expresada como valores de TEAC mmol Trolox/g extracto

El análisis de los datos del diseño experimental proporciona información sobre la importancia de la significación estadística de cada término en el modelo para cada variable respuesta. En la Fig. IV-5 se muestra el diagrama de Pareto para el análisis correspondiente al rendimiento de extracción. La línea vertical indica el corte intervalo de confianza $P > 0,1$ y el color de relleno de los efectos indica la influencia ejercida sobre la variable respuesta, positivo o negativo. Como se puede ver la presión es el término más importante, seguido de su término cuadrático. Como era de esperar tanto la presión como su término cuadrático tienen influencia positiva en el rendimiento, mientras que el aumento de temperatura produce una disminución en el rendimiento total de extracción debido a su efecto inverso sobre la densidad.

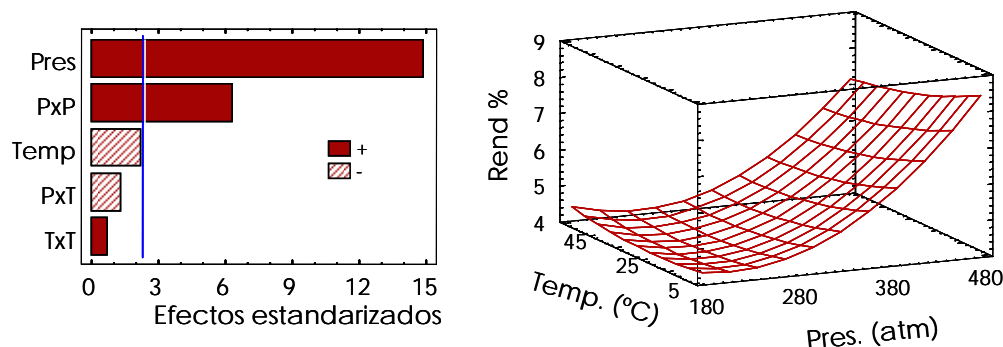


Fig. IV-5.- Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de extracción con los efectos de cada término del modelo divididos entre su error estándar, $\alpha=90\%$, (izquierda) y superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción en función de la presión y la temperatura de extracción

Dado que el término de interacción ($P \times T$) y el término cuadrático de la temperatura ($T \times T$) resultaron no ser significativamente distintos de cero ($P > 0,1$) fueron excluidos del modelo descrito. El modelo matemático fue reajustado por MLR y proporcionó la siguiente ecuación

$$\text{Rendimiento}(\%) = 7.1447 - 0.0248 P - 0.0099 T + 0.0000552 P^2$$

Ecuación IV-2

Donde las unidades de P son atm, y las de T °C. Esta ecuación es capaz de explicar un 98,7% de las variaciones experimentales obtenidas en la variable respuesta ($R^2=0,987$). La desviación estándar residual fue de 0,161, la cual expresada como un porcentaje del valor medio de la variable respuesta ($100 \times \text{RSD}/Y$), proporcionó un error relativo de falta de ajuste menor al 4%. Por tanto, el modelo resultó ser lo suficientemente adecuado para describir los datos obtenidos.

Como se puede ver en la superficie de respuesta de la Fig. IV-5, el aumento en el rendimiento de extracción se consigue mediante aumentos de presión y descensos de temperatura. El software de análisis estadístico Statgraphics proporcionó las condiciones para poder maximizar el rendimiento dentro del intervalo estudiado, siendo estas de 437 atm y 9,8 °C. En esas condiciones, empleando el modelo descrito en la Ecuación IV-2, se obtiene un rendimiento de 6,72%.

En la Fig. IV-6 se muestra la representación de los valores predichos por la Ecuación IV-2 y los valores reales de rendimiento obtenidos. Como se puede ver la armonía entre los valores experimentales y los valores pronosticados por el modelo es muy buena, oscilando entre -0,16 y 0,19.

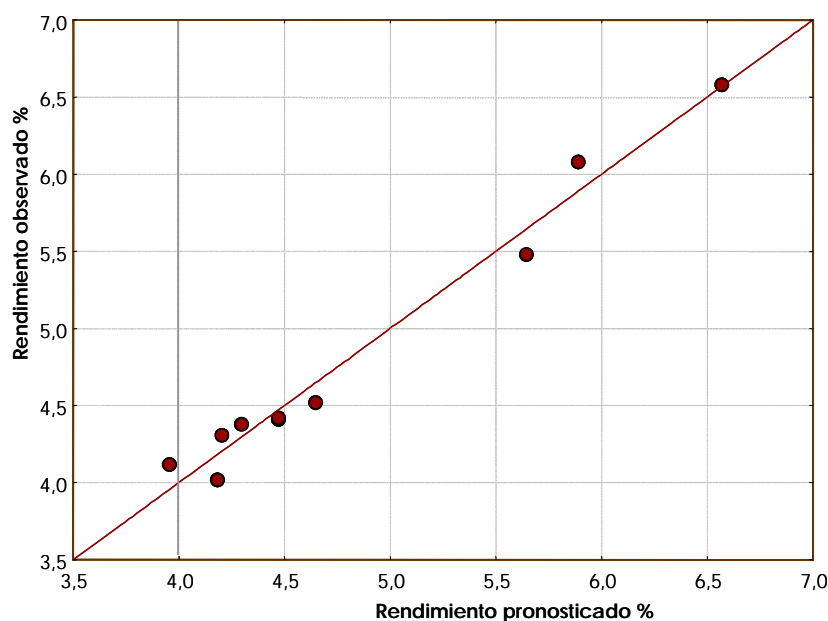


Fig. IV-6.- Representación de los valores de rendimiento predichos por la Ecuación IV-2 y los valores reales observados

3.2. Actividad antioxidante

Tal y como se ha comentado, inicialmente se eligieron dos variables respuesta para optimizar el proceso; el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante. Sin embargo, el ajuste de los datos de actividad antioxidante, Tabla IV-2, basado en presión y temperatura no produjo un modelo matemático aceptable. Tan sólo se alcanzó un R^2 del 0,61, es decir, sólo podía explicarse mediante un modelo que considere únicamente presión y temperatura, un 61 % de la variabilidad experimental obtenida. Esta falta de ajuste puede ser atribuida que la actividad antioxidante no es dependiente sólo de la presencia o ausencia de compuestos que se extraen a mayor o menor presión, sino también de la composición relativa en los extractos. A pesar de que no se pudo obtener un buen modelo matemático para la actividad antioxidante, sí se observa una cierta relación entre la actividad antioxidante y la densidad, que podría ser debida a la diferente solubilidad de los carotenoides a las diferentes presiones (⁶²Careri, Furlattini y col. 2001). Por lo tanto, parece claro que ha de considerarse un modelo más complejo para poder predecir el comportamiento de la actividad antioxidante de los extractos de *Dunaliella salina*.

Con el objetivo de caracterizar químicamente los extractos se empleó HPLC-DAD para poder identificar los carotenoides presentes. En la Fig. IV-7 se puede ver un cromatograma típico obtenido con la columna C30. La identificación de los picos se realizó empleando una mezcla de carotenoides (α y β -caroteno) y otro de all-trans- β -caroteno. El resto de los picos fue identificado comparando tanto los espectros UV-Vis, como el orden de elución basándose en datos publicados previamente por otros autores (⁴²Bononi, Commissati y col. 2002; ⁴³Breithaupt 2004; ⁴¹Strohschein, Pursch y col. 1997).

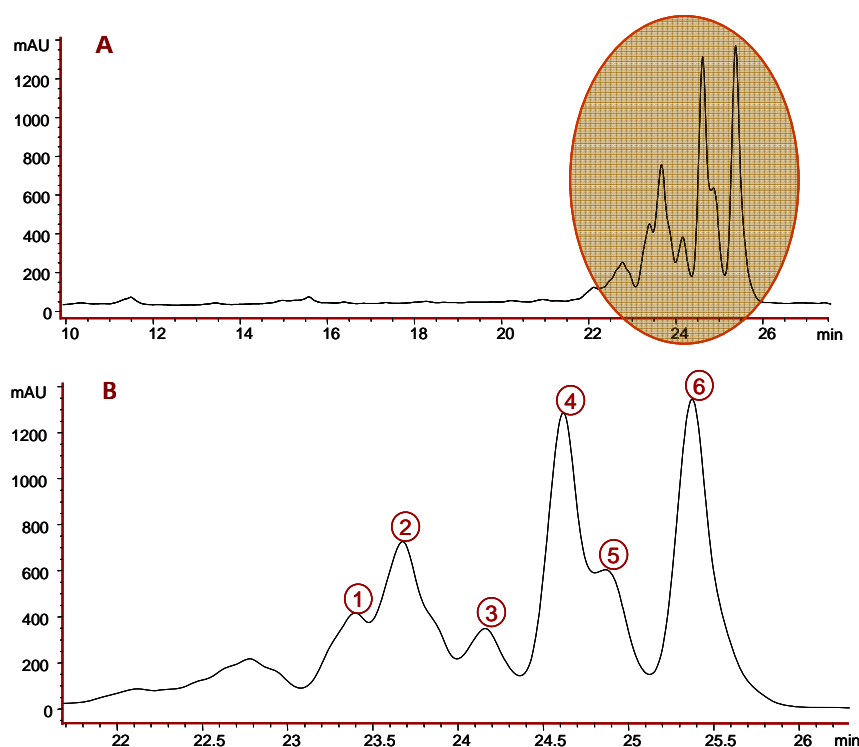


Fig. IV-7.- Cromatograma del extracto 7 adquirido a 450 nm (A) y zoom de la zona de isómeros del β -caroteno, minutos 21 a 27 (B). Identificación de los picos: 1, ϵ -caroteno; 2, α -caroteno; 3, 13-cis- β -caroteno; 4, alltrans- β -caroteno; 5, 15-cis- β -caroteno; y 6, 9-cis- β -caroteno

La composición aproximada de carotenoides de los extractos sub y supercríticos de *Dunaliella* se determinó empleando un calibrado externo con all-trans- β -caroteno y asumiendo el mismo el factor de respuesta para todos los carotenoides. En la Tabla IV-3 se muestra la concentración encontrada para cada compuesto individual y algunas relaciones entre ellos.

Tabla IV-3.- Composición en carotenoides (expresada en mg de compuesto por 100 mg de extracto) de los extractos de CO_2 de *Dunaliella salina* obtenidos en las condiciones de la Tabla IV-1.

Exp.	Carotenoides totales [†]	α -caroteno	β -caroteno					Otros carotenoides [‡]	Relación 9cis/all trans	Relación α/β
			13-cis	All-trans	15-cis	9-cis	Total β			
1	3,223	0,429	0,183	0,486	0,282	0,624	1,575	1,219	1,284	0,273
2	3,086	0,354	0,159	0,518	0,210	0,656	1,543	1,189	1,266	0,229
3	1,250	0,158	0,059	0,221	0,080	0,227	0,587	0,505	1,026	0,269
4	2,702	0,340	0,133	0,468	0,175	0,487	1,264	1,099	1,039	0,269
5	1,176	0,134	0,065	0,132	0,085	0,210	0,491	0,552	1,594	0,273
6	1,987	0,256	0,134	0,301	0,172	0,391	0,998	0,733	1,297	0,256
7	7,199	0,912	0,419	1,244	0,591	1,497	3,751	2,536	1,204	0,243
8	4,251	0,838	0,220	0,650	0,314	0,750	1,934	1,480	1,154	0,433
9	4,651	0,690	0,221	1,048	0,327	0,888	2,485	1,477	0,848	0,278
10	1,614	0,211	0,079	0,335	0,111	0,334	0,860	0,543	0,997	0,245

[†] Medidos como área total del cromatograma

[‡] Incluyendo ϵ -caroteno y zeaxantina entre otros carotenos no identificados

Para poder estudiar las posibles relaciones existentes entre la actividad antioxidante (TEAC) y la composición química de los extractos se empleó el análisis de componentes principales. Mediante

el análisis de clúster se obtuvieron cuatro componentes principales que explicaban el 89,9% del total de la variación de los datos.

El principal componente, que explica por sí sólo un 60% del total de la variación, se correlaciona positivamente con TEAC (0,79), la cantidad total de carotenos (0,99), la concentración de α -caroteno (0,94), 13-cis- β -caroteno (0,98), all-trans (0,97), 15-cis (0,98), 9-cis (0,99), otros carotenoides (0,98) y la suma total de isómeros de β -caroteno (0,99).

El segundo componente principal, que explicaba el 20,9% del total de la varianza, correlacionada negativamente con la presión de extracción (-0,79) y la densidad (-0,89) y positivamente con la relación α/β caroteno (0,75).

Según estos resultados parece claro que hay una importante correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de los diversos carotenoides, lo que confirma la hipótesis previa. Por lo tanto, considerando las cargas de las variables en la componente principal, los extractos que proporcionan mayor actividad antioxidante son aquellos con elevadas concentraciones de carotenos totales, α -caroteno e isómeros de β -caroteno. Este resultado corrobora la teoría, mencionada en la introducción del presente capítulo, sobre la influencia de los diversos isómeros de β -caroteno en la actividad antioxidante global del extracto, remarcando, además, la importancia del empleo de fuentes naturales de carotenoides como antioxidantes (por ejemplo las microalgas) con una composición compleja de carotenoides.

Con objeto de obtener un modelo capaz de predecir la actividad antioxidante de los extractos de CO₂ de *Dunaliella* basado en su composición química, se empleó el método de Wald de regresión lineal múltiple (forward stepwise), considerando como variables independientes las concentraciones de los diferentes carotenoides y las relaciones mostradas en la Tabla IV-3. Se emplearon los valores de 4,0 y 3,9 como estadísticos-F para añadir o quitar variables, respectivamente. Se encontraron tres variables que combinadas permitirían predecir la actividad antioxidante que fueron, en orden decreciente de importancia: concentración de 9-cis- β -caroteno, relación 9-cis/all-trans y la concentración de α -caroteno. Con ello el modelo estimado queda como sigue:

$$\text{TEAC} = 0.332 + 0.3925 \times [\text{9-cis } \beta\text{-caroteno}] - 0.1923 \times [\text{9-cis/all-trans}] - 0.3069 \times [\alpha\text{-caroteno}]$$

Ecuación IV-3

Donde las unidades de las concentraciones son mg compuesto/100 mg extracto.

El modelo produjo un coeficiente de determinación $R^2=0,82$ y un error estándar estimado (RSD) de 0,05. Como se puede ver en esta ecuación, la concentración de α -caroteno contribuye negativamente al valor TEAC, esto es, la actividad antioxidante decrece cuando aumenta la presencia de α -caroteno en los extractos.

El efecto de la concentración del 9-cis caroteno es algo complejo ya que si es considerado aisladamente, contribuye de forma positiva al valor TEAC, mientras que cuando se considera su relación junto al all-trans- β -caroteno se produce una influencia negativa sobre la actividad antioxidante. Si se considera la ecuación en su conjunto, esto es, la contribución de los diferentes factores, se puede observar un comportamiento sinérgico entre los isómeros 9-cis y all-trans. Se obtiene una alta actividad antioxidante cuando la concentración de 9-cis aumenta, hasta llegar a un

máximo, y la concentración de all-trans también aumenta (para minimizar el segundo factor de la ecuación) Es importante remarcar la influencia en la actividad antioxidante total observada de los dos principales isómeros del β -caroteno, 9-cis y all-trans. Algunos autores han demostrado el mayor poder antioxidante del isómero 9-cis puro respecto al all-trans (³³Levin & Mokady 1994), pero en el presente trabajo queda demostrada la contribución sinérgica que se produce entre ambos isómeros.

En la Fig. IV-8 se muestra la representación de los valores reales de TEAC frente a los predichos mediante la Ecuación IV-3. Como se puede ver, el ajuste de las predicciones de TEAC puede ser considerado como apropiado lo que corrobora la utilidad del modelo generado.

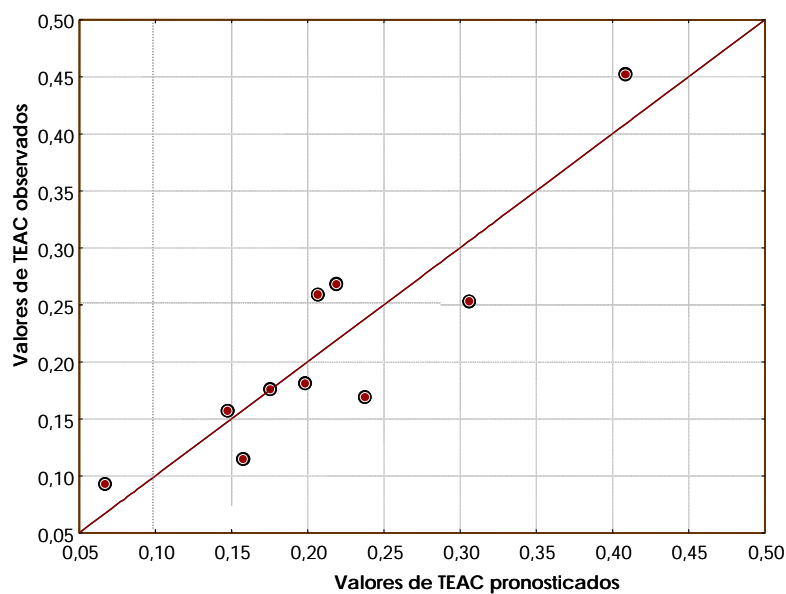


Fig. IV-8.- Representación de los valores de TEAC pronosticados por la Ecuación IV-3 y los valores reales observados

4. CONCLUSIONES

- ✱ En este trabajo se ha demostrado la utilidad de una técnica de extracción novedosa y medioambientalmente limpia como la SFE, para obtener compuestos con actividad antioxidante a partir de la microalga *Dunaliella salina*.
- ✱ Se ha empleado un diseño experimental para optimizar el proceso de extracción, eligiéndose como variable respuesta el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante de los extractos determinada mediante el método de TEAC. De este estudio se concluyó que las mejores condiciones para obtener un elevado rendimiento de extracción consisten en el empleo de elevadas presiones (400 bar) y bajas temperaturas (15 °C), es decir, CO₂ en condiciones subcríticas.
- ✱ Se llevó a cabo una caracterización de los extractos mediante HPLC-DAD, de forma que se pudieron detectar y cuantificar diferentes carotenoides. En los extractos se identificó la presencia de zeaxantina, ϵ -caroteno, α -caroteno, 13-cis- β -caroteno, all trans- β -caroteno, 15-cis- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno.
- ✱ Dada la imposibilidad de obtener un modelo matemático basado en presión y temperatura para predecir el comportamiento de la actividad antioxidante, se empleó un análisis de componentes

principales y MLR. Como resultado de dichos análisis se pudo concluir que la actividad antioxidante está fuertemente influida por la relación de isómeros 9-cis/all-trans presente en los extractos.

- ✖ Los datos obtenidos demuestran la existencia de un efecto sinérgico entre los diversos isómeros del β -caroteno.

5. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning)". Free Radical Research 31(4): 261-272.
- 2.- Halliwell, B., Aeschbach, R. y col. (1995). "The characterization of antioxidants". Food and Chemical Toxicology 33(7): 601-17.
- 3.- Madhavi, D.L., Despande, S.S. y col. (1996). Food antioxidants. New York, Marcel Dekker.
- 4.- Cao, G. & Prior, R.L. (1998). "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum". Clinical Chemistry 44(6): 1309-1315.
- 5.- Aruoma, O.I. (1994). "Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants". Food and Chemical Toxicology 32(7): 671-683.
- 6.- McCord, J.M. (1994). "Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition". Food Technologist 48: 106-110.
- 7.- Alves-Rodrigues, A. & Shao, A. (2004). "The science behind lutein". Toxicology Letters 150(1): 57-83.
- 8.- Le Marchand, L., Hankin, J.H. y col. (1993). "Intake of specific carotenoids and lung cancer risk". Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 2(3): 183-187.
- 9.- Desmettre, T. & Lecerf, J.M. (2005). "Nutrition et degenerescences maculaires liees a l'age". EMC - Ophtalmologie 2(3): 202-217.
- 10.- Koh, H.H., Murray, I.J. y col. (2004). "Plasma and macular responses to lutein supplement in subjects with and without age-related maculopathy: a pilot study". Experimental Eye Research 79(1): 21-27.
- 11.- Burri, B.J. (1997). "Beta-carotene and human health: a review of current research". Nutrition Research 17(3): 547-580.
- 12.- Goodwin, T.W. (1984). The biochemistry of the carotenoids. London, Chapman and Hall.
- 13.- Krinsky, N.I. (2001). "Carotenoids as antioxidants". Nutrition 17(10): 815-817.
- 14.- Opara, E.C. & Rockway, S.W. (2006). "Antioxidants and Micronutrients". Disease-a-Month 52(4): 151-163.
- 15.- Palace, V.P., Khaper, N. y col. (1999). "Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease - protection of LDL by vitamin". Free Radical Biology and Medicine 26(5): 746-761.
- 16.- Sharoni, Y., Danilenko, M. y col. (2004). "Carotenoids and transcription". Archives of biochemistry and biophysics 430(1): 89-96.
- 17.- Voutilainen, S., Nurmi, T. y col. (2006). "Carotenoids and cardiovascular health". The American journal of clinical nutrition 83(6): 1265-1271.
- 18.- Chidambara Murthy, K.N., Vanitha, A. y col. (2005). "In vivo antioxidant activity of carotenoids from Dunaliella salina -- a green microalga". Life Sciences 76(12): 1381-1390.
- 19.- Poppel, G.V. & Goldbohm, R.A. (1995). "Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention". American Journal of Clinical Nutrition 62: 1393-1402.
- 20.- Tapiero, H., Townsend, D.M. y col. (2004). "The role of carotenoids in the prevention of human pathologies". Biomedicine & Pharmacotherapy 58: 100-110.
- 21.- Bast, A. & Haenen, G.R.M.M. (2002). "The toxicity of antioxidants and their metabolites". Environmental Toxicology and Pharmacology 11(3-4): 251-258.
- 22.- Olmedilla, B., Granado, F. y col. (2001). Carotenoides y salud humana. Madrid, Fundación Española de la Nutrición.

- 23.- Palozza, P., Serini, S. *y col.* (2003). "Prooxidant effects of b-carotene in cultured cells". Molecular Aspects of Medicine 24(6): 353-362.
- 24.- Paolini, M., Abdel-Rahman, S.Z. *y col.* (2003). "β-Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen?" Mutation Research/Reviews in Mutation Research 543(3): 195-200.
- 25.- Wang, X.D. & Russell, R.M. (1999). "Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of β-carotene". Nutrition Reviews 57(9 I): 263-272.
- 26.- Cohen, Z. (1999). Chemicals from microalgae. London, Taylor & Francis.
- 27.- Olaizola, M. (2003). "Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace". Biomolecular Engineering 20: 459-466.
- 28.- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C. *y col.* (2006). "Commercial applications of microalgae". Journal of Bioscience and Bioengineering 101(2): 87-96.
- 29.- Richmond, A. (1986). Handbook of microalgal mass culture. Boca Ratón, Florida, CRC Press.
- 30.- Vorst, P. (1995). Production of carotene with chemostat cultures of *Dunaliella*. Institute for Molecular Cell Biology. Amsterdam, Universiteit van Amsterdam. PhD Thesis: 106 pp.
- 31.- Borowitzka, M.A. (1999). Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. Chemicals from microalgae. Z. Cohen. London, UK, Taylor & Francis: 313-352.
- 32.- Oren, A. (2005). "A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005". Saline Systems (Open Access) 1(2): 1-14, doi:10.1186/1746-1448-1-2.
- 33.- Levin, G. & Mokady, S. (1994). "Antioxidant activity of 9-cis compared to all-trans β-carotene in vitro". Free Radical Biology and Medicine 17(1): 77-82.
- 34.- Stahl, W., Schwarz, W. *y col.* (1993). "Human serum concentrations of all-trans β and α-carotene but not 9-cis β-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene)". Journal of nutrition 123(183-191).
- 35.- Rodriguez-Bernaldo de Quiros, A. & Costa, H.S. (2006). "Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review". Journal of Food Composition and Analysis 19(2): 97-111.
- 36.- Schoefs, B. (2002). "Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis". Trends in Food Science and Technology 13(11): 361-371.
- 37.- Su, Q., Rowley, K.G. *y col.* (2002). "Carotenoids: separation methods applicable to biological samples". Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 781(1-2): 393-418.
- 38.- Weber, R.W.S., Anke, H. *y col.* (2007). "Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid". Journal of Chromatography A 1145(1): 118-122.
- 39.- Schieber, A. & Carle, R. (2005). "Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications". Trends in Food Science & Technology 16(9): 416-422.
- 40.- Sander, L.C., Sharpless, K.E. *y col.* (1994). "Development of Engineered Stationary Phases for the Separation of Carotenoid Isomers". Analytical Chemistry 66(10): 1667-1674.
- 41.- Strohschein, S., Pursch, M. *y col.* (1997). "Structure elucidation of b-carotene isomers by HPLC-NMR coupling using a C₃₀ bonded phase". Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 357(5): 498-502.
- 42.- Bononi, M., Commissati, I. *y col.* (2002). "A simplified method for the HPLC resolution of α-carotene and β-carotene (trans and cis) isomers". Analytical and Bioanalytical Chemistry 372(2): 401-403.
- 43.- Breithaupt, D.E. (2004). "Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction". Food Chemistry 86(3): 449-456.
- 44.- Lesellier, E., Gurdale, K. *y col.* (1999). "Separation of cis /trans isomers of b-carotene by supercritical fluid chromatography". Journal of Chromatography A 844: 307-320.
- 45.- Mendes, R.L., Fernandes, H.L. *y col.* (1995). "Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*". Food Chemistry 53(1): 99-103.
- 46.- Mendes, R.L., Nobre, B.P. *y col.* (1999). "Solubility of b-carotene in supercritical carbon dioxide and ethane". The Journal of Supercritical Fluids 16: 99–106.
- 47.- Gamlieli-Bonshtein, I., Korin, E. *y col.* (2002). "Selective separation of cis-trans geometrical isomers of β-carotene via CO₂ supercritical fluid extraction". Biotechnology and Bioengineering 80(2): 169-174.
- 48.- Ben-Amotz, A., Shaish, A. *y col.* (1989). "Mode of action of the massively accumulated β-carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation." Plant Physiology 91: 1040-1043.

- 49.- **Re, R., Pellegrini, N. y col.** (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". Free Radical Biology and Medicine 26(9-10): 1231-1237.
- 50.- **Miller, N.J., Rice-Evans, C. y col.** (1993). "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates". Clinical Science 84(4): 407-412.
- 51.- **Miller, N.J., Sampson, J. y col.** (1996). "Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls". FEBS Letters 384(3): 240-242.
- 52.- **Spigno, G., Tramelli, L. y col.** (2007). "Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics". Journal of Food Engineering 81(1): 200-208.
- 53.- **Stratil, P., Klejdus, B. y col.** (2007). "Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals". Talanta 71(4): 1741-1751.
- 54.- **Long, L.H., Kwee, D.C. y col.** (2000). "The antioxidant activities of seasonings used in Asian cooking. Powerful antioxidant activity of dark soy sauce revealed using the ABTS assay". Free radical research 32(2): 181-186.
- 55.- **Paixao, N., Perestrelo, R. y col.** (2007). "Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines". Food Chemistry 105(1): 204-214.
- 56.- **Gasowski, B., Leontowicz, M. y col.** (2004). "The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile". Journal of Nutritional Biochemistry 15(9): 527-533.
- 57.- **Herrero, M., Jaime, L. y col.** (2006). "Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids". Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(15): 5597-5603.
- 58.- **Ibañez, E., Oca, A. y col.** (1999). "Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants". Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 1400-1404.
- 59.- **Cocero, M.J., González, S. y col.** (2000). "Supercritical extraction of unsaturated products. Degradation of β -carotene in supercritical extraction processes". The Journal of Supercritical Fluids 19: 39-44.
- 60.- **Favati, F., King, J.W. y col.** (1998). "Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates". Journal of Food Science 53(5): 1532-1536.
- 61.- **Ibañez, E., López-Sebastián, S. y col.** (1998). "Separation of carotenoids by subcritical fluid chromatography with coated, packed capillary columns and neat carbon dioxide". Journal of Chromatography A 823(1-2): 313-319.
- 62.- **Careri, M., Furlattini, L. y col.** (2001). "Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach". Journal of Chromatography A 912(1): 61-71.

V. Capítulo V: Actividad antimicrobiana en
extractos sub y supercríticos de *Dunaliella salina*

1. Introducción.....	113
1.1. Objetivos y plan de trabajo	113
2. Materiales y métodos.....	114
2.1. Muestras y reactivos	114
2.2. Metodología de extracción	114
2.3. Medida de la actividad antimicrobiana.....	114
2.4. Caracterización química: GC-MS.....	115
2.4.1. Análisis de la fracción volátil.....	115
2.4.2. Análisis de ácidos grasos	116
3. Resultados y discusión	116
3.1. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Dunaliella</i>	116
3.2. Análisis de ácidos grasos en los extractos	119
3.3. Análisis de la fracción volátil de los extractos	120
4. Conclusiones	123
5. Bibliografía.....	124

1. INTRODUCCIÓN

Diversos resultados a lo largo de la presente memoria han demostrado que las microalgas pueden considerarse una buena fuente natural de compuestos con actividad antioxidante e incluso antimicrobiana. Estos compuestos antimicrobianos de origen natural serían potencialmente utilizables por la industria alimentaria para como sustitutos de los aditivos sintéticos. Debido a la importancia del origen natural que presentan estos ingredientes también se hace necesaria la inclusión en su obtención de tecnologías limpias como son la SFE o la PLE (extracción con líquidos presurizados).

La actividad antimicrobiana en las microalgas se ha atribuido a compuestos de muy diversa índole pertenecientes a diferentes familias químicas que incluyen indoles, terpenos, acetogeninas, fenoles, ácidos grasos o hidrocarburos volátiles halogenados (¹Cardoso, Guaratini *y col.* 2006; ²Mayer & Hamann 2005). Sin embargo, la identidad y mecanismo de actuación de la mayoría de ellos aún está por descubrir

La microalga, del género Chlorophyta, *Dunaliella salina* ha sido objeto de muy diversos estudios como fuente de carotenoides (³García-González, Moreno *y col.* 2005; ⁴Oren 2005). No obstante, muy pocos estudios se han realizado para evaluar el potencial antimicrobiano de *Dunaliella* (⁵Chang, Ohta *y col.* 1993; ⁶Herrero, Ibanez *y col.* 2006; ⁷Ohta, Shiomi *y col.* 1995). Por ello, parece interesante abordar el estudio de la potencialidad antimicrobiana de los extractos de *Dunaliella salina* obtenidos por SFE en diferentes condiciones de extracción, lo que en definitiva constituye el objetivo fundamental del presente trabajo.

Además se propone la caracterización exhaustiva de los extractos que presenten bioactividad, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Como ya se comentó en el Capítulo III, la cromatografía de gases ha sido ampliamente empleada para caracterizar compuestos con actividad antimicrobiana provenientes de diversas fuentes naturales, sobre todo aceites esenciales de plantas (⁸Couladis, Chinou *y col.* 2002; ⁹Palic, Stojanovic *y col.* 2002; ¹⁰Santoyo, Lloria *y col.* 2006; ¹¹Seidel & Taylor 2004), pero también de algas (¹²Barreto & Meyer 2006; ⁶Herrero, Ibanez *y col.* 2006; ¹³Karabay-Yavasoglu, Sukatar *y col.* 2007).

1.1. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo del presente capítulo es desarrollar un proceso limpio de extracción basado en el empleo de CO₂ sub y supercrítico para obtener extractos con actividad antimicrobiana potencialmente utilizables por la industria alimentaria como conservantes. Además, se llevó a cabo una caracterización exhaustiva de los compuestos presentes en los extractos que pudieran asociarse con su actividad antimicrobiana.

Para ello se diseñó el siguiente plan de trabajo

- ✖ Obtención mediante SFE de extractos de *Dunaliella salina* empleando diferentes condiciones de extracción.
- ✖ Medida de la actividad antimicrobiana de los extractos frente a diversos microorganismos.

- ✱ Caracterización mediante GC-MS de la fracción más volátil de los extractos así como de los ácidos grasos presentes en los mismos, previa derivatización.

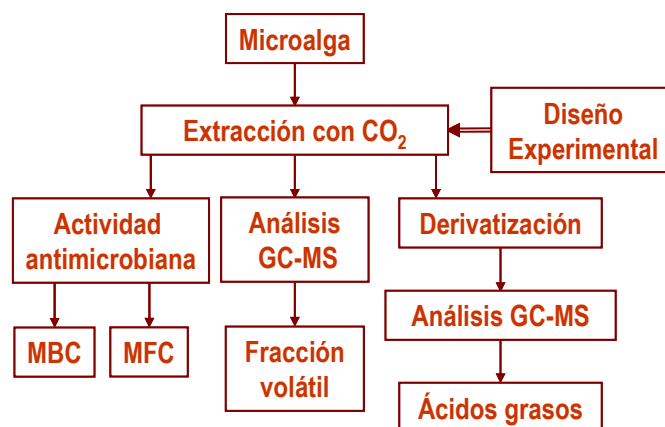


Fig. V-1.- Esquema de trabajo empleado para la obtención y caracterización antimicrobiana de los extractos de *Dunaliella salina*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras y reactivos

Las muestras de microalga y el CO₂ empleados han sido descritos previamente en el capítulo IV.

El metilato sodico 0,5 N (CH₃ONa), así como los patrones de ácidos grasos empleados (PUFA No. 1, fuente marina) fueron proporcionadas por Supelco (Belfonte, EEUU), los patrones de n-alcanos fueron suministrados por Sigma (Madrid) y el resto de disolventes por Labscan (Dublín, Irlanda).

2.2. Metodología de extracción

El equipo y las condiciones de extracción empleados fueron los mismos que se describen en el capítulo IV, Tabla IV-1.

2.3. Medida de la actividad antimicrobiana

Tanto las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* empleadas, como su cultivo se describen en detalle en el capítulo III. Asimismo el protocolo de análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC), y las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas (MBC y MFC, respectivamente) también son las descritas en profundidad en el capítulo III.

2.4. Caracterización química: GC-MS

Los extractos que presentaron mejores actividades antimicrobianas se analizaron mediante GC-MS para determinar la composición química tanto de su fracción más volátil, como de los ácidos grasos. Para ello se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, EEUU) equipado con inyector manual con divisor de flujo (split/splitless) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo Agilent 5973N. El sistema estaba controlado mediante el software MSD Chemstation. En la Fig. V-2 se muestra una foto del equipo de análisis instrumental empleado.



Fig. V-2.- Equipo de GC-MS empleado para el análisis de los extractos de *Dunaliella salina* (cortesía de la Dra. M^a Victoria Moreno)

2.4.1. Análisis de la fracción volátil

Para el análisis de la fracción volátil se empleó una columna capilar de sílice SE-54 (HP-5MS) de Quadrex (Woodbridge, EEUU), cuyas dimensiones eran 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (longitud × diametro interno × espesor de fase estacionaria). La inyección se llevó a cabo en modo split (1:20) a 250 °C, se inyectaron 2 μl de los extractos disueltos a una concentración de 5 mg/ml. El gas portador empleando fue helio como a una presión de 7 psi.

El gradiente de temperaturas empleado fue el siguiente: 2 minutos a la temperatura inicial (40 °C), seguidos de un aumento a 5 °C/min hasta alcanzar 150 °C/min y finalmente un aumento de 15 °C/min hasta alcanzar 300 °C.

Para prolongar la vida media del filamento del detector de MS se estableció un tiempo de retraso en la detección de 4 minutos. Los espectros se adquirieron en modo *scan* empleando un intervalo de masas de 35 a 450 m/z. Los espectros de masas obtenidos se compararon con los presentes en una biblioteca de espectros (Wiley Registry of Mass Spectral Data) y con datos encontrados en la bibliografía. Además, para identificar los compuestos de manera más precisa se calcularon sus Índices de Retención lineales (RI). Para ello se emplearon mezclas de patrones de alcanos de n-undecano a n-octacosano (Sigma Aldrich, Madrid) disueltos en hexano. Estos alcanos se analizaron en las mismas condiciones de separación que las muestras. Posteriormente, se calcularon

los RI del resto de los compuestos en función de las diferencias en tiempos de retención de los alcanos precedentes y posteriores a cada uno de los compuestos

2.4.2. *Análisis de ácidos grasos*

Para llevar a cabo el análisis de los ácidos grasos por GC-MS se realizó una derivatización (metilación en este caso) de los extractos de *Dunaliella*. Para preparar los metil ésteres tanto de los ácidos grasos libres como de los esterificados presentes, se prepararon disoluciones de 2 mg/ml de las muestras en cloroformo:metanol (2:1, v/v). Estas disoluciones se metilaron tras la adición de 1 ml de solución metanol-base (metilato sódico) 0,5 N. La mezcla se dejó reaccionar a 65 °C durante 45 minutos, tiempo tras el cual se cortó la reacción por adición de 0,5 ml de agua mQ. Los metilésteres resultantes se extrajeron con dos volúmenes de 1 ml de hexano. Para evitar introducir residuos acuosos al cromatógrafo se añadió una punta de espátula de sulfato sódico al vial de inyección.

Los análisis se llevaron a cabo empleando una columna Carbowax (polietilenglicol) de Quadrex (Woodbridge, EEUU), cuyas dimensiones eran 60 m × 0,25 mm × 0,5 µm (longitud × diámetro interno × espesor de fase estacionaria). La programación de temperaturas que permitió la separación de los compuestos fue: 100 °C (temperatura inicial), a una velocidad de 20 °C/min se alcanzaron 220 °C, temperatura a la que se mantuvo durante 25 min para luego aumentar a 15 °C/min hasta los 270 °C, y se mantuvo 10 min. El resto de las condiciones de separación fueron similares a las del análisis de la fracción volátil.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Dunaliella*

La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por SFE se determinó mediante la medida de los parámetros MBC y MFC. La actividad de los extractos fue medida frente a cuatro microorganismos *Staphylococcus aureus* (bacteria gram positiva), *Escherichia coli* (bacteria gram negativa), *Candida albicans* (levadura) y *Aspergillus niger* (hongo). En la

Tabla V-1 y en la Fig. V-3 se muestran los valores de MBC y MFC para cada uno de los extractos.

Los resultados muestran que todos los extractos de CO₂ presentaron importantes actividades antimicrobianas frente a *E. coli*, *S. Aureus* y *C. albicans*, no obstante, estos extractos presentaron una inhibición muy débil (alto MFC) frente al hongo *A. niger*. Entre las bacterias, *S. aureus* resultó ser, en general, más sensible a los extractos de *Dunaliella* que *E. Coli*.

Tabla V-1.- Actividades antimicrobianas de los diferentes extractos de *Dunaliella salina*.

Exp.	P (atm)	T (°C)	<i>E. coli</i> MBC [◇]	<i>S. aureus</i> MBC [◇]	<i>C. albicans</i> MFC [◇]	<i>A. niger</i> MFC [◇]
1	310	27,5	11,1±0,8	8,6±0,5	8,5±0,3	35,4±0,9
2	310	27,5	11,0±0,6	8,4±0,7	8,5±0,5	35,2±1,0
3	400	40	7,3±0,5	7,1±0,2	8,7±0,6	32,4±0,9
4	400	15	10,5±0,7	8,5±0,3	9,0±0,3	32,5±0,8
5	220	40	5,9±0,6	6,0±0,2	8,6±0,3	32,2±0,9
6	220	15	10,0±0,4	8,3±0,4	8,5±0,6	35,8±1,2
7	437,3	27,5	6,4±0,2	7,0±0,1	9,0±0,2	31,4±0,7
8	182,7	27,5	6,1±0,3	6,2±0,3	8,5±0,4	32,4±0,5
9	310	45,2	11,2±0,6	8,6±0,4	9,2±0,5	32,8±0,7
10	310	9,8	3,1±0,4	3,9±0,3	8,3±0,4	30,0±0,5
Antibiótico de referencia			10,2±0,5	10,1±0,4	100,4±1,5	150,7±1,8

◇.- MBC y MFC expresadas en mg/ml para los extractos y en µg/ml para el antibiótico de referencia Se muestran las concentraciones biocidas por considerarse más adecuadas para la comparación de datos que las MIC.

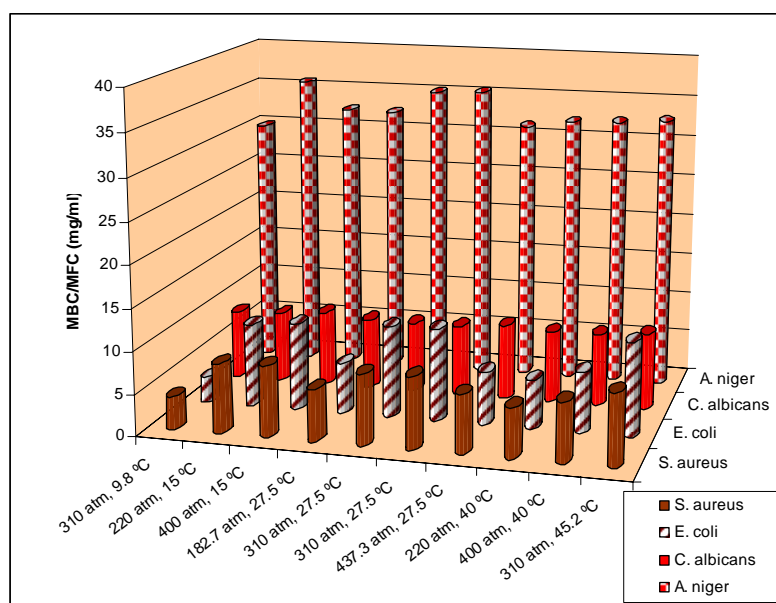


Fig. V-3.- Representación de las actividades antimicrobianas de los extractos de *Dunaliella salina* (datos ordenados por orden creciente de temperatura de izquierda a derecha)

El extracto más activo fue el obtenido en el experimento 10 (310 atm, 9,8 °C). A esta presión de trabajo, la actividad antimicrobiana de los extractos decrece con el aumento de la temperatura de extracción, es decir, o bien los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana son más solubles a bajas temperaturas (altas densidades) o a estas temperaturas se producen menos pérdidas de compuestos microbicidas. Cuando se trabaja a menores presiones de extracción, 182,7 y 220 atm, la actividad antimicrobiana de los extractos también es menor que la obtenida en el experimento 10, especialmente en el experimento 6 (220 atm, 15 °C). También, trabajando con presiones de extracción superiores a 310 atm, la actividad antimicrobiana de los extractos fue, en todos los casos, menor que la obtenida en el experimento 10. Sin embargo, el análisis de los datos indicó que la

influencia de las diferentes condiciones de extracción en la actividad antimicrobiana de los extractos se limitaba únicamente a las bacterias, puesto que en el caso de *Candida* no se hallaron diferencias significativas entre las actividades de los extractos.

Varios autores han estudiado el potencial antimicrobiano de las microalgas, siendo éste atribuido a diversos compuestos pertenecientes a familias químicas que incluyen indoles, terpenos, acetogeninas, fenóles, ácidos grasos o hidrocarburos volátiles halogenados (¹Cardoso, Guaratini y col. 2006; ²Mayer & Hamann 2005). Por ejemplo, la actividad antimicrobiana se atribuye a la presencia de ácidos grasos insaturados como el γ -linoleico (¹⁴de Mule, de Caire y col. 1996; ¹⁵Santoyo, Herrero y col. 2006), como ya se demostró en el Capítulo III. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de los extractos de *Dunaliella salina* se atribuye no sólo a la presencia de diversos ácidos grasos (¹⁶Borowitzka 1999) sino también a otros compuestos volátiles presentes en los extractos y que han sido descritos previamente como agentes antimicrobianos: α -y β -iononas, β -cyclocitral, neofitadieno o fitol (⁶Herrero, Ibanez y col. 2006). Por estos motivos se realizó una caracterización exhaustiva tanto de los ácidos grasos como de la fracción volátil mediante GC-MS.

3.2. Análisis de ácidos grasos en los extractos

Se realizó un análisis de los ácidos grasos presentes en los extractos con el objetivo de relacionar los perfiles de los mismos con su actividad antimicrobiana tal y como sugiere la hipótesis de Borowitzka (¹⁶Borowitzka 1999). En la Tabla V-2 se muestran los resultados obtenidos (identificación, % área normalizada y cuantificación en ppm) para los experimentos que presentaron mayor (exp. 10) y menor (exp. 1) actividad antimicrobiana, así como uno de actividad intermedia (exp. 5). Como ejemplo se muestra en la Fig. V-4 un cromatograma de GC-MS (en modo TIC, total ion chromatogram) del exp. 10 tras haber sido derivatizado.

Tabla V-2.- Perfiles de ácidos grasos de los extractos de CO₂ de *Dunaliella salina* medidos por GC-MS: identificación, % área normalizada, y concentración

Pico	tR (min)	Ácido graso	Exp. 1*		Exp. 5*		Exp. 10†	
			%	ppm [◇]	(%)	ppm [◇]	(%)	ppm [◇]
1	10,9	C14	1,1	31,6	1,3	81,7	1,0	72,2
2	14,1	C16	49,0	1399,3	31,6	2005,1	37,0	2676,3
3	14,8	C16:1	2,0	58,4	1,6	101,0	2,2	159,6
4	15,8	C16:2	0,6	16,6	0,6	38,4	0,6	40,2
5	17,6	C16:3	3,0	86,0	2,9	181,2	2,4	170,3
6	18,6	C16:4	8,7	248,2	7,7	492,6	6,1	441,5
7	19,4	C18	17,8	509,5	12,1	768,7	13,1	945,9
8	20,4	C18:1	11,5	328,3	15,6	989,2	16,9	1221,8
9	21,8	C18:2 ^{Δ6,9}	0,3	8,5	0,5	29,7	0,5	33,2
10	22,3	C18:2 ^{Δ9,12}	2,2	62,5	6,7	425,5	6,1	442,4
11	23,8	C18:3 ^{Δ6,9,12}	0,8	21,9	1,3	81,4	1,0	74,8
12	25,5	C18:3 ^{Δ9,12,15}	3,0	84,5	18,2	1154,1	13,3	959,9

*.- Exp. 1: 310 atm, 27,5°C; †.- Exp. 5: 220 atm, 40°C; ‡.- Exp. 10: 310 atm, 9,8 °C

◇.- ppm = μg de ácido graso / g extracto

Como se puede observar los principales compuestos detectados fueron los ácidos palmítico (C16), oleico (C18:1) y α -linolenico (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$); llegando a representar hasta un 80% del área total del cromatograma. Estos resultados concuerdan con los datos de la literatura, ya que todos ellos han sido detectados previamente en *Dunaliella*. Diversos estudios han relacionado sus concentraciones y su presencia relativa con las condiciones de cultivo (¹⁷Azachi, Sadka *y col.* 2002; ¹⁸Xu & Beardall 1997).

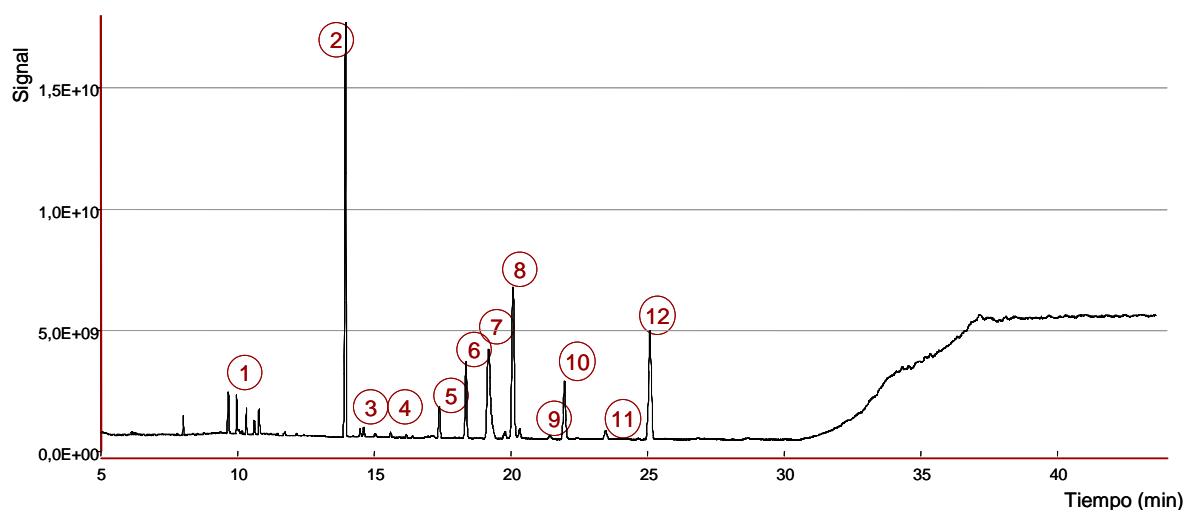


Fig. V-4.- Perfil GC-MS de ácidos grasos obtenido tras derivatización de la muestra 10. Identificación de los picos como en la Tabla V-2

Al comparar entre los diversos experimentos podemos ver como los perfiles de los extractos 5 y 10 presentaron bastante similitud, teniendo ambos la concentración de α -linolénico muy elevada. Por el contrario, el extracto 1 mostró un perfil algo diferente, presentando un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) que los experimentos 5 y 10. Dado que la actividad antimicrobiana ha sido atribuida a los ácidos grasos insaturados de cadena larga, incluyendo oleico, linoleico y linolénico (¹⁹Benkendorff, Davis *y col.* 2005), este hecho podría explicar la baja actividad antimicrobiana del experimento 1. Además, los ácidos grasos saturados de cadena larga, palmítico y esteárico se consideran menos activos frente al crecimiento de microorganismos (¹¹Seidel & Taylor 2004; ²⁰Sun, O'Connor *y col.* 2003; ²¹Zheng, Yoo *y col.* 2005), lo que reforzaría esta idea. Aunque estos datos podrían explicar la menor actividad de los extractos con un perfil de ácidos grasos similar al experimento 1. Sin embargo, no serían suficientes para explicar las diferencias encontradas entre los experimentos 5 y 10 en cuanto a su actividad antimicrobiana ya que no existen diferencias significativas en cuanto a su composición de ácidos grasos.

3.3. Análisis de la fracción volátil de los extractos

Considerando que las diferencias en cuanto a composición de ácidos grasos no era suficiente para poder explicar las diferencias entre las actividades microbicidas de los extractos de SFE, se llevó a cabo un análisis de la fracción volátil de los mismos.

En la Tabla V-3 se muestran los datos de la composición de volátiles de los extractos obtenidos con CO₂ de *Dunaliella salina*. Los datos que se muestran son: la identificación, las áreas absolutas, las áreas normalizadas (contribución relativa de cada compuesto) y los índices de retención (RI). Como se dijo anteriormente, los compuestos fueron identificados comparando sus espectros con la biblioteca de espectros de Wiley y comparando sus RI con los teóricos de cada compuesto. En la Fig. V-5 se muestra un cromatograma del extracto que produjo la mejor actividad antimicrobiana, esto es, experimento 10 (310 atm y 9,8 °C).

En la fracción volátil se detectaron e identificaron 14 compuestos pero dos de ellos (11 y 13), no pudieron ser inequívocamente identificados. Muchos de los compuestos detectados forman parte del metabolismo de los carotenoides o bien son productos de su degradación, como por ejemplo el monoterpene β -ciclocitral y los sesquiterpenos α y β -ionona (²²Sommerburg, Langhans y col. 2003; ¹⁸Xu & Beardall 1997), compuestos que han demostrado tener cierta actividad antimicrobiana (²³Anzaldi, Sottofattori y col. 1999; ²⁴Ikawa, Sasner y col. 2001; ²⁵Kubo, Muroi y col. 1992; ²⁶Muroi & Kubo 1993). Además, otros compuestos de la Tabla V-3 son comúnmente encontrados en las algas del género *Chlorophyta* (genero al que pertenece *Dunaliella*), por ejemplo, el ácido hexadecanoico o el fitol. El diterpene fitol se ha encontrado en diversos aceites esenciales de plantas con actividad antimicrobiana (⁸Couladis, Chinou y col. 2002), de hecho, se ha descrito que algunos derivados del fitol presentan actividad antimicrobiana (²⁷Ragasa, De Luna y col. 2005).

Otro de los compuestos mayoritarios es el neofitadieno, este hidrocarburo pertenece a la familia de los fianos y, además, ha sido encontrado en altas concentraciones en aceites esenciales con elevada actividad antimicrobiana procedentes de hojas de tabaco (²⁸Alagic, Stancic y col. 2006)

El principal factor discriminante entre las muestras es la presencia, en el extracto 10, de un derivado del metil-1H-indol (pico número 11). El espectro de masas de este compuesto sugiere la presencia de, al menos, un grupo metil-1H-indol en la molécula (pico base igual a 130 m/z) aunque el ión molecular (371 m/z) y su RI sugieren una estructura más compleja. Esta estructura presenta un tiempo de retención mayor al esperado (2483 frente a ~1400 del 3-metil-1H-indol). La presencia de este compuesto no ha sido descrita en *Dunaliella salina*, sin embargo, sí hay evidencias de la presencia de otros derivados indólicos en algas verdes, *Chlorophyta* (²⁹Shi, Han y col. 2005) y verde-azuladas, *Cyanobacterium* (³⁰Huber, Moore y col. 1998).

Tabla V-3.- Identificación mediante GC-MS de los compuestos de la fracción volátil

Pico	T _R (min)	RI	Compuesto	Exp. 1		Exp. 5		Exp. 10	
				Área Norm. (%)	Área (cuentas de área)	Área Norm. (%)	Área (cuentas de área)	Área Norm. (%)	Área (cuentas de área)
1	19,1	1278,3	3,3-dimethyl-2,7-octanediona	--	--	--	--	2,39	4842242
2	24,5	1486,5	β-ionona	1,34	79092	3,26	16382532	5,66	11450204
3	25,3	1534,5	5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuranona	1,93	113636	4,44	22334227	8,52	17233763
4	27,3	1682,3	4-Oxo-β-ionona	2,87	169374	2,03	10216608	2,35	4751393
5	28,8	1842,1	Neofitadieno	1,04	61591	3,34	7810841	2,23	4517520
6	29,5	1933,7	Nerolidol	3,16	186086	--	--	--	--
7	29,6	1932,5	9-hexadecanoic, etil éster	--	--	4,23	21281282	--	--
8	29,8	1963,4	Ácido Hexadecanoico	12,42	732160	22,76	114560591	24,08	48725455
9	30,7	2099,9	Fitol	--	--	0,7	3532342	--	--
10	31,0	2144,8	9,12,15-octadecatrienoic, metil éster	19,39	1143238	36,05	181404282	25,83	52267951
11	33,0	2483,1	Derivado del 1H-indol	--	--	--	--	4,47	9049616
12	33,1	2496,6	Monoglicérido del ácido hexadecanoico	1,31	76625	--	--	1,56	3159673
13	35,9	3457,4	Derivado del neofitadieno	31,79	1874243	1,43	7195739	--	--
14	37,2	3473,1	Vitamina E	24,75	1458774	21,76	109525930	2,91	46367123
TOTAL				100	5894819	100	494244374	100	202364940

En general, los derivados indólicos presentan una elevada actividad antimicrobiana (³¹Capparelli, Ventimiglia *y col.* 2007; ³²Gundersen, Charnock *y col.* 2007; ³³Jat, Salvi *y col.* 2006; ³⁴Kalinovskaya, Ivanova *y col.* 2004; ³⁵Malinka & Swiatek 2004; ³⁶Oh, Mar *y col.* 2006; ³⁷Ryu, Lee *y col.* 2007). Algunos indoles complejos como, por ejemplo, el 3-metil-1H-indol carboxi sustituido ha demostrado una gran actividad antimicrobiana, bien sea extraído a partir de bacterias (³⁸Gutierrez-Lugo, Woldemichael *y col.* 2005) o de plantas (³⁹Tanaka, Silva *y col.* 2006).

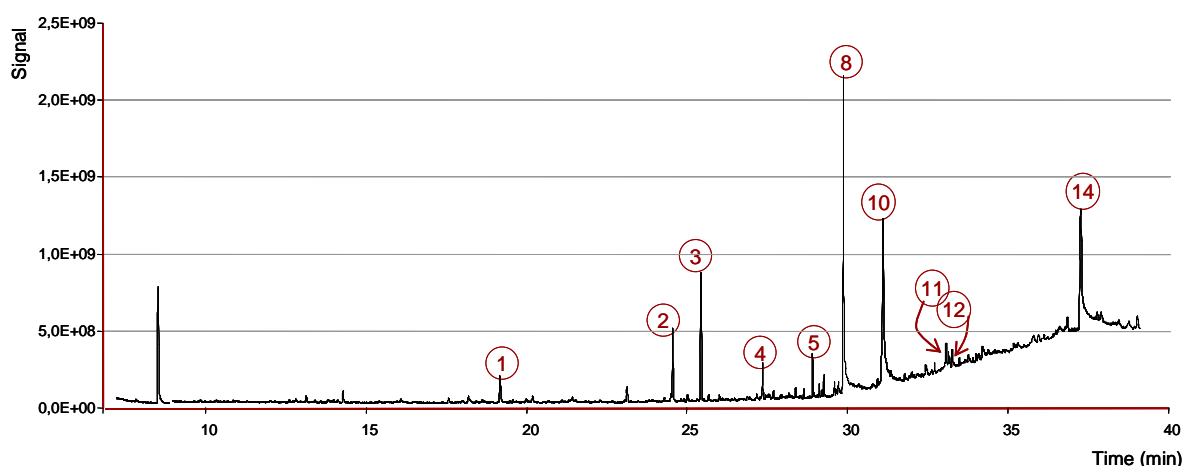


Fig. V-5.- Cromatograma de GC-MS de la fracción volátil del extracto 10. Identificación de los picos en Tabla V-3

4. CONCLUSIONES

- ✖ En el estudio realizado en el presente capítulo, se ha demostrado la capacidad del CO₂ en condiciones sub y supercríticas para obtener extractos con actividad antimicrobiana a partir de la microalga *Dunaliella salina*.
- ✖ Gracias al ensayo de actividad antimicrobiana realizado frente a diversos microorganismos, se comprobó que los extractos más activos, se obtenían empleando presiones elevadas y bajas temperaturas.
- ✖ Los extractos se caracterizaron mediante GC-MS. De este modo se pudieron identificar, tanto en su fracción volátil como en su perfil de ácidos grasos, compuestos que previamente habían sido descritos como potencialmente antimicrobianos, por ejemplo, β -ciclocitral, α y β -ionona, fitol y un derivado indólico. De hecho, se trata de la primera vez que un derivado indólico complejo ha sido descrito en *Dunaliella*. Entre los ácidos grasos los mayoritarios fueron el hexadecanoico, palmítico, oleico y α -linoleico.
- ✖ Las mejores condiciones para obtener extractos con elevada actividad antimicrobiana fueron 310 atm y 9,8 °C, esto es, empleando CO₂ en condiciones líquido-subcríticas

5. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Cardoso, K.H.M., Guaratini, T. y col.** (2006). "Metabolites from algae with economical impact". Comparative Biochemistry and Physiology doi: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007.
- 2.- **Mayer, A.M.S. & Hamann, M.T.** (2005). "Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; Affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action". Comparative Biochemistry and Physiology 140(3-4): 265-286.
- 3.- **García-González, M., Moreno, J. y col.** (2005). "Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor". Journal of Biotechnology 115(1): 81-90.
- 4.- **Oren, A.** (2005). "A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005". Saline Systems (Open Access) 1(2): 1-14, doi:10.1186/1746-1448-1-2.
- 5.- **Chang, T., Ohta, S. y col.** (1993). "Antibiotic substances produced by a marine green alga, *dunaliella primolecta*". Bioresource Technology 44(2): 149-153.
- 6.- **Herrero, M., Ibanez, E. y col.** (2006). "*Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials". Journal of Food Protection 69(10): 2471-2477.
- 7.- **Ohta, S., Shiomi, Y. y col.** (1995). "Antibiotic effect of linolenic acid from *Chlorococcum* strain HS-101 and *Dunaliella primolecta* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". Journal of Applied Phycology 7(2): 121-127.
- 8.- **Couladis, M., Chinou, I.B. y col.** (2002). "Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Ballota pseudodictamnus* L. Benth". Phytotherapy Research 16(8): 723-726.
- 9.- **Palic, R., Stojanovic, G. y col.** (2002). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of the oriental tobacco, *Prilep*". Flavour and Fragrance Journal 17(5): 323-326.
- 10.- **Santoyo, S., Lloria, R. y col.** (2006). "Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization". European Food Research and Technology 222(5-6): 565-571.
- 11.- **Seidel, V. & Taylor, P.W.** (2004). "In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria". International Journal of Antimicrobial Agents 23(6): 613-619.
- 12.- **Barreto, M. & Meyer, J.J.M.** (2006). "Isolation and antimicrobial activity of a lanosol derivative from *Osmundaria serrata* (Rhodophyta) and a visual". South African Journal of Botany 72(4): 521-528.
- 13.- **Karabay-Yavasoglu, N.U., Sukatar, A. y col.** (2007). "Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*". Phytotherapy research : PTR 21(2): 153-156.
- 14.- **de Mule, M.C.Z., de Caire, G.Z. y col.** (1996). "Bioactive substances from *Spirulina platensis* (Cyanobacteria)". Phyton 58: 93-96.
- 15.- **Santoyo, S., Herrero, M. y col.** (2006). "Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*". European Food Research and Technology 224(1): 75-81.
- 16.- **Borowitzka, M.A.** (1999). Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. Chemicals from microalgae. Z. Cohen. London, UK, Taylor & Francis: 313-352.
- 17.- **Azachi, M., Sadka, A. y col.** (2002). "Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*". Plant Physiology 129(3): 1320-1329.
- 18.- **Xu, X.Q. & Beardall, J.** (1997). "Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake". Phytochemistry 45(4): 655-658.
- 19.- **Benkendorff, K., Davis, A.R. y col.** (2005). "Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties". Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 316(1): 29-44.
- 20.- **Sun, C.Q., O'Connor, C.J. y col.** (2003). "Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*". FEMS Immunology and Medical Microbiology 36(1-2): 9-17.
- 21.- **Zheng, C.J., Yoo, J.S. y col.** (2005). "Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids". FEBS Letters 579(23): 5157-5162.
- 22.- **Sommerburg, O., Langhans, C.D. y col.** (2003). " β -carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid - A model for neutrophil-derived degradation". Free Radical Biology and Medicine 35(11): 1480-1490.

- 23.- Anzaldi, M., Sottofattori, E. *y col.* (1999). "Synthesis and antimicrobial activity of heterocyclic ionone-like derivatives". European Journal of Medicinal Chemistry 34(10): 837-842.
- 24.- Ikawa, M., Sasner, J.J. *y col.* (2001). "Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth". Hydrobiologia 443: 19-22.
- 25.- Kubo, I., Muroi, H. *y col.* (1992). "Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects". Journal of Agricultural and Food Chemistry 40(2): 245-248.
- 26.- Muroi, H. & Kubo, I. (1993). "Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*". Journal of agricultural and Food Chemistry 41(7): 1102-1105.
- 27.- Ragasa, C.Y., De Luna, R.D. *y col.* (2005). "Antimicrobial terpenoids from *Pterocarpus indicus*". Natural Product Research 19(4): 305-309.
- 28.- Alagic, S., Stancic, I. *y col.* (2006). "Chemical composition of the supercritical CO₂ extracts of the Yaka, Prilep and Otlja tobaccos". Journal of Essential Oil Research 18(2): 185-188.
- 29.- Shi, D.Y., Han, L.J. *y col.* (2005). "A new halogenated biindole and a new Apo-carotenone from green alga *Chaetomorpha basiretorsa* setchell". Chinese Chemical Letters 16(6): 777-780.
- 30.- Huber, U., Moore, R.E. *y col.* (1998). "Isolation of a nitrile-containing indole alkaloid from the terrestrial blue-green alga *Hapalosiphon delicatulus*". Journal of Natural Products 61(10): 1304-1306.
- 31.- Capparelli, R., Ventimiglia, I. *y col.* (2007). "Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (acne vulgaris)". Journal of Biotechnology 128(3): 606-614.
- 32.- Gundersen, L.L., Charnock, C. *y col.* (2007). "Synthesis of indolizine derivatives with selective antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*". European Journal of Pharmaceutical Sciences 30(1): 26-35.
- 33.- Jat, J.L., Salvi, V.K. *y col.* (2006). "Synthesis and antimicrobial evaluation of some pyrazolo-thiazolyl alkoxy-1H-isoindole-1, 3(2H)-dione derivatives". Journal of Sulfur Chemistry 27(5): 445-453.
- 34.- Kalinovskaya, N.I., Ivanova, E.P. *y col.* (2004). "Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species". Current Microbiology 48(6): 441-446.
- 35.- Malinka, W. & Swiatek, P. (2004). "Indole mannich bases and their antimycobacterial effect". Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research 61(2): 107-111.
- 36.- Oh, K.B., Mar, W. *y col.* (2006). "Antimicrobial activity and cytotoxicity of bis(indole) alkaloids from the sponge *Spongosorites* sp". Biological and Pharmaceutical Bulletin 29(3): 570-573.
- 37.- Ryu, C.K., Lee, J.Y. *y col.* (2007). "Synthesis and antifungal activity of 1H-indole-4,7-diones". Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 17(1): 127-131.
- 38.- Gutierrez-Lugo, M.T., Woldemichael, G.M. *y col.* (2005). "Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. P1068." Natural Product Research 19(7): 645-652.
- 39.- Tanaka, J.C.A., Silva, C.C.d. *y col.* (2006). "Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*". Brazilian Journal of Medical and Biological Research 39(3): 387-391.

VI. Capítulo VI: Obtención de extractos extractos
supercríticos de *Chaetoceros muelleri*.
Caracterización de su actividad antimicrobiana

1. Introducción.....	129
1.1. Objetivos y plan de trabajo	130
2. Materiales y métodos.....	131
2.1. Obtención de microalgas	131
2.2. Reactivos	131
2.3. Extracción supercrítica	131
2.4. Análisis del material lipídico	132
2.4.1. HPLC-ELSD	132
2.4.2. GC-FID	132
2.5. Medida de la actividad antimicrobiana.....	133
2.6. Análisis estadístico	133
3. Resultados y discusión	133
3.1. Extracción supercrítica	133
3.2. Actividad antimicrobiana.....	135
3.3. Composición lipídica de los extractos	136
3.4. Análisis estadístico	138
4. Conclusiones	139
5. Bibliografía.....	140

1. INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria las microalgas diatomeas son un componente básico de las operaciones de acuicultura, ya que son una fuente de ácidos grasos poliinsaturados (¹Chiou, Su y col. 2001). Como se describió en la introducción, la diatomea *Chaetoceros muelleri* (gracilis) está considerada como una de las cepas más populares para alimentar al zooplancton que, a su vez, servirá de sustento a larvas de camarones y otros crustáceos. La composición lipídica de *Chaetoceros*, al igual que de la práctica totalidad de microalgas, depende de las condiciones de cultivo. Los principales componente de la fracción lipídica de *Chaetoceros* cuando se cultiva *ex-profeso* son triglicéridos, lípidos polares y ácidos grasos libres (²Pernet, Tremblay y col. 2003).

Como ha quedado patente en capítulos anteriores, los ácidos grasos son capaces de interferir con el crecimiento bacteriano y su supervivencia, algo conocido desde hace décadas (³Benkendorff, Davis y col. 2005). Los estudios que relacionan la estructura de los ácidos grasos libres frente al crecimiento de bacterias patógenas para los humanos han demostrado que la actividad depende tanto de la longitud de la cadena como del grado de insaturación (⁴Kabara, Vrable y col. 1977). También se ha demostrado que la presencia de compuestos como el colesterol, puede antagonizar el efecto bactericida de los ácidos grasos (⁵Galbraith, Miller y col. 1971). Por consiguiente, la composición tanto cualitativa como cuantitativa puede tener influencia en las propiedades antimicrobianas de los extractos (³Benkendorff, Davis y col. 2005). Este hecho es especialmente importante en *Chaetoceros muelleri*, ya que el colesterol es uno de los lípidos que se ha descrito previamente en este microalga (⁶Parrish, Wells y col. 1999; ²Pernet, Tremblay y col. 2003).

Si bien la extracción supercrítica es una técnica bien conocida para extraer diversos tipos de lípidos (⁷Birtigh, Johannsen y col. 1995; ⁸Hurtado-Benavides, Señoráns y col. 2004), tal y como se ha demostrado en capítulos anteriores, la extracción de lípidos polares y ácidos grasos libres puede mejorarse si se añaden pequeñas cantidades de etanol en el proceso de obtención de los extractos (⁹Rodrigues, Reipert y col. 2005).

Dado que en este caso el material lipídico a examinar es mucho más amplio que una simple caracterización de su perfil de ácidos grasos, se ha de emplear una técnica de análisis que permita la caracterización exhaustiva. Muchos son los métodos desarrollados en cromatografía de gases para el análisis de ácidos grasos o de esteroides de forma aislada, pero cuando se trata del análisis global de la fracción lipídica, las elevadas temperaturas que se emplean en GC pueden provocar termólisis de determinados compuestos presentes en esta fracción (¹⁰Abidi 2001). Es por ello que la cromatografía líquida gana cada vez más terreno, en general los métodos desarrollados para este efecto suelen emplear columnas de fase estacionaria polar (separaciones en fase normal), como por ejemplo cianopropil (¹¹Elhamdy & Christie 1993) o diol (¹²Schaefer, Kuchler y col. 2003). La característica común de este tipo de trabajos consiste en el acoplamiento de HPLC con detectores evaporativos de dispersión de luz (ELSD). Este tipo de detectores no está limitado ni por la naturaleza del disolvente (polar o apolar), ni por los caudales de fase móvil (escala analítica o preparativa) ni precisa el empleo de elevadas temperaturas. Además, cuando se emplea ELSD no suelen ser necesarios pasos de

derivatización para obtener respuestas cuantitativas (¹³Becart, Chevalier y col. 1990). Por todas estas ventajas, HPLC-ELSD fue la técnica elegida en este trabajo para llevar a cabo la para la caracterización de las distintas fracciones lipídicas. Además, se empleó GC-FID para el análisis de los ácidos grasos presentes en los extractos.

1.1. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo de esta investigación consiste en examinar la potencial actividad antimicrobiana de extractos supercríticos de *Chaetoceros muelleri* obtenidos bajo diversas condiciones de presión y temperatura. Asimismo, se estudian los efectos que ejercen estos factores en el rendimiento global de la extracción supercrítica, y la composición lipídica de los extractos para poder establecer una correlación entre dicha composición y la actividad antimicrobiana. El plan de trabajo seguido para el desarrollo del presente trabajo es el siguiente:

- ✱ Obtención mediante SFE de extractos de *Chaetoceros muelleri* empleando diferentes condiciones de extracción.
- ✱ Medida de la actividad antimicrobiana de los extractos frente a diversos microorganismos.
- ✱ Análisis mediante HPLC-ELSD para la cuantificación de las diversas fracciones lipídicas de los extractos.
- ✱ Caracterización mediante GC-FID de los ácidos grasos presentes en los mismos, previa derivatización.

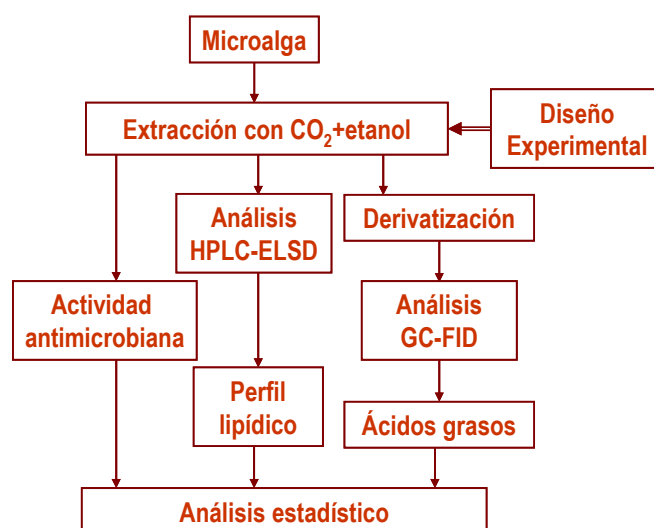


Fig. VI-1.- Esquema de trabajo empleado para la caracterización antimicrobiana de los extractos supercríticos de *Chaetoceros muelleri*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de microalgas

Las muestras de la microalga *Chaetoceros muelleri* (gracilis) fueron cedidas por la Dra. Bertha O. Arredondo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, La Paz, México. Fueron cultivadas en condiciones de maximización de biomasa. Concretamente se cultivó en lotes en medio f/2 (¹⁴Guillard & Ryther 1962), con adición de silicatos. El cultivo fue sincronizado previamente con tres periodos de cuatro días de iluminación ($100 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) mediante tubos fluorescentes en ciclos 12:12 de luz:oscuridad. La temperatura y la salinidad se mantuvieron a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y 35 PSU, mientras que el pH varió entre 7,5 y 8,2. Las condiciones de crecimiento del cultivo fueron específicamente determinadas mediante una cámara Neubauer de conteo de células. La recolección de células se realizó al final de la fase logarítmica de crecimiento mediante centrifugación a 7000 rpm/min durante 10 minutos. Tras liofilización las microalgas se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción.

2.2. Reactivos

El CO_2 , calidad N48, para realizar las extracciones fue suministrado por AL Air liquide España (Madrid).

Todos los disolventes empleados de Labscan (Dublín, Irlanda) a excepción del etanol absoluto de Panreac Química (Barcelona), quien también suministró el ácido sulfúrico 95%.

2.3. Extracción supercrítica

Al igual que en los capítulos dedicados a *Dunaliella*, se empleó un extractor Suprex PrepMaster (Thar Designs, Pittsburg, USA) de escala analítica.

En todas las extracciones se empleó 1 g de *Chaetoceros* mezclado con 0,2 mL de etanol absoluto (Panreac, Barcelona). El caudal de CO_2 se reguló empleando una válvula de aguja como restrictor de apertura variable. El tiempo total de extracción se fijó en 60 minutos; 15 de extracción estática y 45 en régimen dinámico. Los extractos fueron recogidos en un vial de vidrio enfriado mediante un baño de hielo.

En la Tabla VI-1 se pueden ver las condiciones de extracción empleadas, éstas han sido sugeridas por G. Brunner como las más apropiadas para la extracción de material lipídico (¹⁵Brunner 2005). Las presiones oscilaron entre 200 y 400 atm y las temperaturas entre 40 y 80 °C. Las diferentes combinaciones de presión-temperatura dieron lugar a densidades comprendidas entre 0,6 y 0,96 g/mL.

Tabla VI-1.- Condiciones experimentales empleadas para la obtención de extractos SFE de *Chaetoceros muelleri*

Exp.	Presión (atm)	Temperatura (°C)	Densidad CO ₂ (g/mL)
1	400	80	0,854
2	400	40	0,957
3	200	80	0,594
4	200	40	0,841
5	300	60	0,831
6	300	60	0,831

2.4. Análisis del material lipídico

2.4.1. HPLC-ELSD

Los análisis de HPLC-ELSD se realizaron en una columna Kromasil con sílice como fase estacionaria (250mm×4.6 mm, Análisis Vínicos, Tomelloso). El equipo, HPLC Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón), estaba acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz ELSD-LT de Shimadzu.

El gradiente de fases móviles consistió es el descrito en la Tabla VI-2, adaptación del método desarrollado por Torres y col (¹⁶Torres, Vazquez y col. 2005) Todas las muestras se inyectaron disueltas en cloroformo:etanol 2:1 (v/v), el volumen de inyección en todos los casos fue de 20 µl.

Tabla VI-2.- Gradiente de fases móviles empleado para el análisis de lípidos en extractos de *Chaetoceros muelleri*

Tiempo (min)	Isooctano	MTBE + 0,01% ác. formico	Isopropanol
0	99,5	0,5	0
3	99,5	0,5	0
3,01	98,5	1,5	0
20	89	11	0
30	75	25	0
30,01	71	27	2
50	71	27	2
50,01	75	25	0
60	75	25	0
61	99,5	0,5	0
70	99,5	0,5	0

2.4.2. GC-FID

Previamente al análisis de los ácidos grasos por GC-FID fue necesario un paso de derivatización para aumentar la volatilidad de los mismos. Al igual que ocurría con *Spirulina*, los extractos podían contener etanol residual por lo que se optó por la opción de etilación para evitar la

formación mezclas metil-etil-ésteres. Para llevar a cabo la derivatización se mezcló 1 ml de ácido sulfúrico en etanol (5% v/v) con los extractos previamente disueltos en cloroformo:etanol (2:1). Tras un periodo de incubación de 12-15 horas a 50 °C, la reacción se paró por adición de 200 µl de agua mQ. Los etilésteres de ácidos grasos resultantes fueron separados mediante dos extracciones secuenciales con 1 ml de n-hexano. A la mezcla resultante se añadió una punta de espátula de sulfato sódico anhidro para absorber la posible agua residual y evitar así su introducción en el cromatógrafo de gases. Posteriormente se inyectó 1 µl de esta solución en el cromatógrafo.

Los etilésteres se analizaron empleando el equipo y el método descrito en el Capítulo II, sección 2.4.4.

La identificación de los ésteres de ácidos grasos se realizó por comparación con el tiempo de retención de los correspondientes patrones. La identificación de los diversos etilésteres de ácidos grasos se realizó por comparación con un patrón de aceite de róbalo (menhaden oil standard, #4-7085) de Supelco (Bellefonte, EEUU).

2.5. Medida de la actividad antimicrobiana

Tanto las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Candida albicans* empleadas, como su cultivo se describen en detalle en el capítulo III. Asimismo el protocolo de análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC), y las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas (MBC y MFC, respectivamente) también son las descritas en profundidad en el capítulo III.

2.6. Análisis estadístico

El método de análisis estadístico para correlacionar los datos fue el análisis de clúster (Average Linkage method from standardized variables). Este método se emplea para descubrir agrupamientos naturales entre las variables analizadas y los principales componentes del análisis. Para ello se empleó el paquete estadístico Statgraphics 5.1 para Windows (Manugistic Software, Virginia, EEUU).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción supercrítica

Los rendimientos de extracción obtenidos a las diferentes condiciones de presión-temperatura estudiadas se muestran en la Tabla VI-3. Como se puede ver los rendimientos a estas condiciones oscilaron entre 1,8 y 3,9 %. A pesar de que se probaron diversos pretratamientos para las microalgas empleando ultrasonidos y microondas no se consiguieron aumentos significativos de los rendimientos de extracción.

Tabla VI-3.- Rendimientos de extracción obtenidos en las extracciones con CO₂ de *Chaetoceros muelleri* a las diferentes condiciones estudiadas

Exp.	Presión (atm)	Temperatura (°C)	Densidad CO ₂ (g/mL)	Rendimiento ‰
1	400	80	0,854	3,4
2	400	40	0,957	3,9
3	200	80	0,594	1,8
4	200	40	0,841	2,6
5	300	60	0,831	2,2
6	300	60	0,831	2,2

Estos bajos rendimientos pueden ser debidos a la dureza y composición de la pared celular de las microalgas diatomeas. Estas microalgas poseen una pared celular de sílice y *Chaetoceros muelleri* no es una excepción (¹⁷Sze 1986). Este tipo de pared celular podría evitar la difusión de compuestos hacia el exterior así como evitar la penetración del CO₂ en el interior de la célula. Incluso considerando estos bajos rendimientos se puede observar una cierta tendencia. En el extracto 3 (200 atm y 80 °C) se obtuvo el menor rendimiento de extracción, mientras que el mayor se consiguió en las condiciones del experimento 2 (400 atm y 40 °C), que, como era de esperar, corresponde a las condiciones de máxima densidad. Esta tendencia de aumento del rendimiento con la presión se puede observar en la Fig. VI-2 y corrobora los resultados obtenidos por otros autores sobre la extracción de diversos compuestos a partir de microalgas (¹⁸Andrich, Zinnai y col. 2005; ¹⁹Lim, Lee y col. 2002).

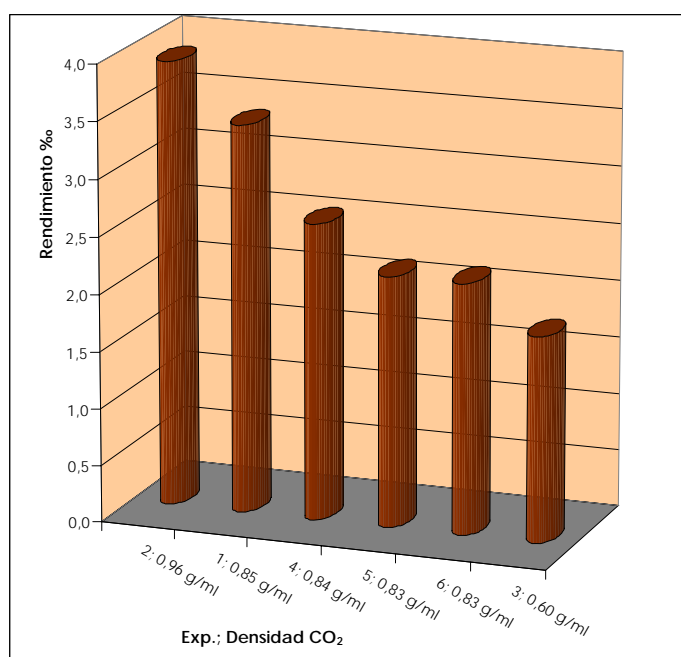


Fig. VI-2.- Representación de los rendimientos obtenidos por orden decreciente de densidad de extracción

A pesar de los bajos rendimientos obtenidos se prosiguió con el estudio de actividad antimicrobiana dado el enorme interés en encontrar nuevas fuentes naturales de conservantes alimentarios, cosméticos y farmacéuticos.

3.2. Actividad antimicrobiana

Dados los escasos rendimientos obtenidos sólo pudo medirse la actividad biocida frente a tres microorganismos, a diferencia de las otras microalgas (*Spirulina* y *Dunaliella*) donde se emplearon cuatro microorganismos. Los empleados para medir la actividad antimicrobiana de los extractos de *Chaetoceros* fueron: *Staphylococcus aureus* (bacteria gram positiva), *Escherichia coli* (bacteria gram negativa) y *Candida albicans* (levadura). La actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por SFE se determinó mediante la medida de los parámetros MBC y MFC. En la Tabla VI-4 se muestran los valores de MBC y MFC para cada uno de los extractos.

Tabla VI-4.- Valores de actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de *Chaetoceros muelleri*

Exp.	E. coli MBC [◇]	S. aureus MBC [◇]	C. albicans MFC [◇]
1	15	15	9
2	12	12	7
3	12	12	7
4	15	17	9
5	12	12	7
Extracto en DMSO	25	25	22
Antibiótico	10	10	100

◇.- MBC y MFC expresadas en mg/ml para los extractos y en µg/ml para el antibiótico de referencia

Los resultados de la Tabla VI-4 muestran que el microorganismo más sensible a la presencia de extractos de *Chaetoceros* en su medio de cultivo fue *Candida albicans*, con los menores valores de MFC, mientras que *E. coli* y *S. Aureus* fueron los menos sensibles. Comparando los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de extracción los más activos fueron los correspondientes a los experimentos 2, 3 y 5, seguidos de 1 y 4. Estos datos parecen indicar que el empleo de valores medios de presión y temperatura favorece la extracción de compuestos con actividad microbici da. Además, el empleo de presión y temperatura elevados (400 atm y 80 °C) produce extractos menos activos. Este comportamiento es muy difícil de explicar basándose únicamente en los datos de presión-temperatura, dada la complejidad de los extractos obtenidos, puesto que en función de las condiciones de extracción se favorece el enriquecimiento del extracto en determinados compuestos y se pueden producir interacciones y sinergias entre ellos. Es interesante destacar que, en general, estos extractos poseen una buena actividad antimicrobiana, lo que podría ser de interés para la industria alimentaria.

En la Tabla VI-4 se muestran los datos comparativos de la actividad antimicrobiana de un extracto de *Chaetoceros* obtenido con DMSO mediante una extracción líquido-líquido. Se eligió DMSO ya que posee una polaridad similar a la del agente de extracción empleado en SFE (CO₂+etanol). Como se puede observar, la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos con DMSO es hasta 3 veces menor que la obtenida con los extractos de SFE. Además, la SFE tiene otra serie de ventajas como los menores volúmenes de disolventes empleados o la posibilidad de utilizar los extractos directamente sobre matrices alimentarias ya que no se emplean disolventes de alta toxicidad, en oposición a las extracciones líquido-líquido clásicas.

3.3. Composición lipídica de los extractos

En anteriores capítulos ha quedado patente la importancia de los ácidos grasos como responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos supercríticos de microalgas. En este trabajo se analizaron además las diferentes familias lipídicas extraídas. En la Fig. VI-3 se muestra un cromatograma obtenido con HPLC-ELSD de uno de los extractos supercríticos de *Chaetoceros* (exp. 3). Como se puede ver, con el método propuesto por Torres y col (¹Torres, Vazquez y col. 2005) se consigue una buena separación, a línea base, de triglicéridos (TAG), diglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG), esteroides, ácidos grasos libres (FFA) e hidrocarburos.

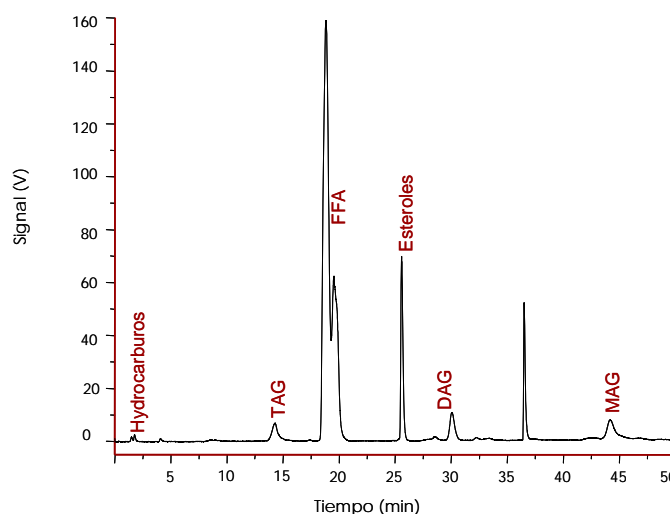


Fig. VI-3.- Cromatograma obtenido con HPLC-ELSD del extracto de *Chaetoceros muelleri* obtenido a 200 atm y 80°C (Exp. 3)

En la Fig. VI-4 se muestra un gráfico con la comparación en composiciones de los extractos obtenidos en las condiciones de la Tabla VI-3, así como un extracto líquido-líquido obtenido empleando cloroformo:etanol 2:1 (disolvente con el se extrajo la mayor cantidad de material lipídico). Como se puede ver, los ácidos grasos libres (FFA) fueron, en general, los principales componentes de los extractos, llegando a representar hasta el 75% del total en peso de los lípidos. La siguiente familia en orden de abundancia fueron los esteroides, seguidos de los diglicéridos, triglicéridos y monoglicéridos. Según trabajos previos (⁶Parrish, Wells y col. 1999; ²Pernet, Tremblay y col. 2003) la fracción de esteroides de *Chaetoceros* está formada principalmente por colesterol. Como se puede ver en la Fig. VI-4, la contribución de las diferentes familias al total de la fracción lipídica depende principalmente de las condiciones de extracción, lo que corrobora la especificidad que proveen las extracciones en las que se emplea CO₂ como agente de extracción

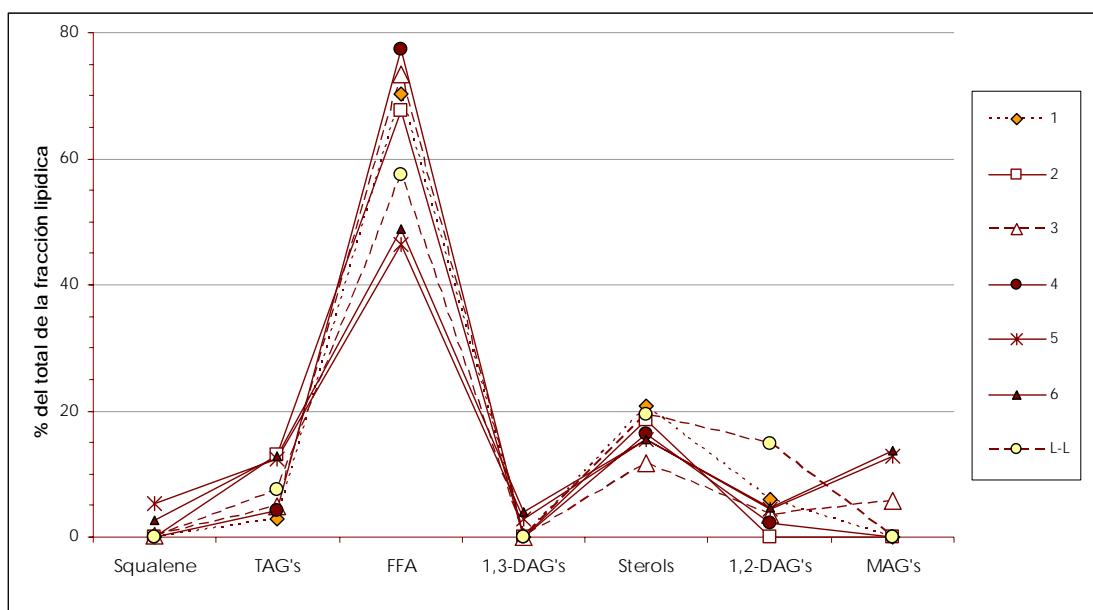


Fig. VI-4.- Composición en familias de lípidos de los extractos SFE de *Chaetoceros muelleri* y de un extracto líquido-líquido (L-L). Nomenclatura: TAG: Triglicéridos; FFA: Ácidos grasos libres; 1,3-DAG's: 1,3-Diacilglicéridos; 1,2-DAG's: 1,2-Diacilglicéridos; MAG's: Monoglicéridos

La fracción de ácidos grasos libres se sometió a un análisis exhaustivo empleando GC-FID ya que la actividad antimicrobiana está, básicamente, asociada al contenido en determinados ácidos grasos (²⁰Borowitzka 1999; ²¹Skrivanova, Marounek y col. 2005). En la Fig. VI-5 se muestra un cromatograma del extracto que produjo la mejor actividad antimicrobiana, extracto 3 (200 atm, 80 °C). El cromatograma se encuentra dividido en las zonas donde los ácidos grasos tienen la misma longitud de cadena. Se puede ver que la fracción de los C16 (C16:0, C16:2, C16:3) es la más abundante, pero es importante remarcar también la presencia en los extractos de ciertos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (EPA, DPA y DHA), ácidos grasos altamente relacionados con actividad microbiciada (³Benkendorff, Davis y col. 2005). La distribución de los diferentes ácidos grasos detectados en los extractos SFE comparados con el L-L, se muestra en la Fig. VI-6.

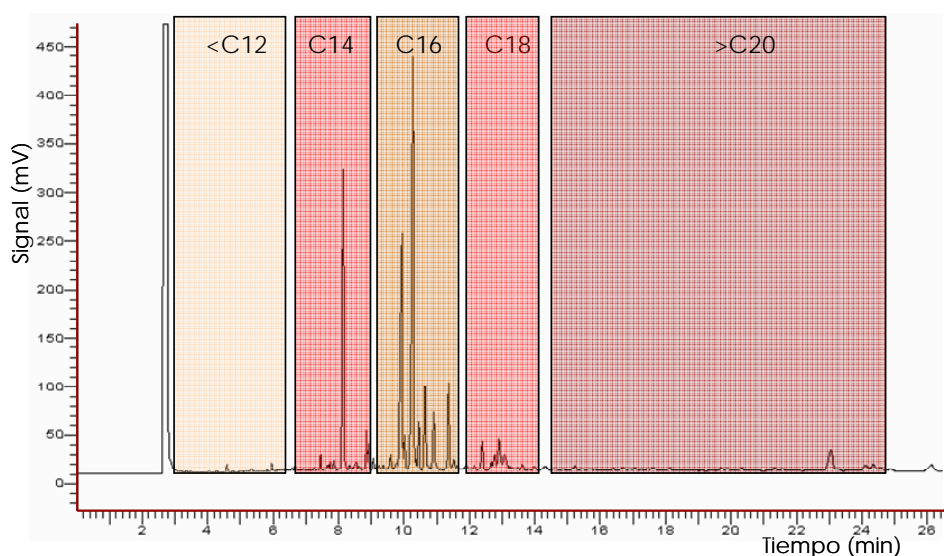


Fig. VI-5.- Cromatograma GC-FID de extracto 3 tras derivatización. Los rectángulos delimitan las zonas con la misma longitud de cadena de ácido graso

Como se puede observar, existen grandes diferencias de composición entre los diferentes extractos entre sí y con el extracto obtenido por métodos “convencionales”. Como ya se ha comentado, estas diferencias demuestran la capacidad de la extracción supercrítica para modificar la polaridad y la capacidad de solvatación del fluido extractante mediante pequeños cambios en la P y/o T de extracción.

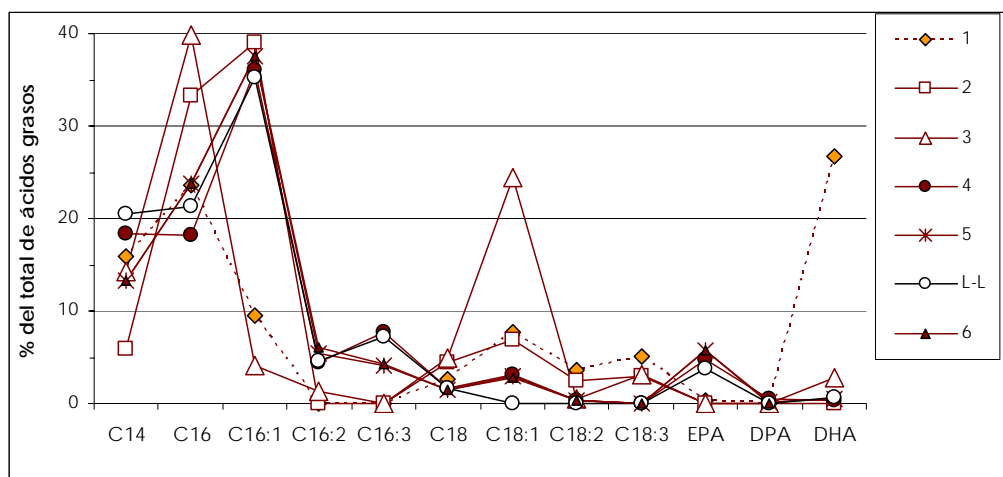


Fig. VI-6.- Distribución de ácidos grasos en los extractos SFE y un extracto líquido-líquido (L-L) de *Chaetoceros muelleri*

3.4. Análisis estadístico

Para poder establecer correlaciones entre la actividad antimicrobiana de los extractos y su composición lipídica se realizó un análisis de clúster, incluyendo el contenido en TAG, DAG, MAG, FFA, esteroides, hidrocarburos, así como la composición relativa (como porcentaje molar) de ácidos grasos. En la Fig. VI-7 se muestra un dendograma⁹ usando como medida de similitud el coeficiente de correlación de Pearson. En este dendograma se puede observar una relación significativa entre las actividades antimicrobianas frente a todos los microorganismos y el contenido en TAG y DPA. Existe una correlación negativa entre la actividad antimicrobiana y los TAG (con coeficientes de correlación de Pearson que varían entre -0,745 y -0,796) y una correlación positiva con el DPA (con coeficientes de correlación de Pearson para la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* igual a 0,839), lo que implica que un aumento de la concentración de DPA provoca un aumento en la concentración bactericida o fungicida mínimas (MBC ó MFC), esto es, una menor actividad microbicida. El efecto contrario se produce con la concentración de TAG, al aumentar ésta, la actividad antimicrobiana crece puesto que se obtienen valores menores de MBC ó MFC. Aunque en el clúster se pueden observar otras variables agrupadas entre sí, ninguna guarda relación con la actividad antimicrobiana. A pesar de que los ácidos grasos libres se suelen asociar fuertemente con la actividad antimicrobiana de diversos extractos (⁴Kabara, Vrable y col. 1977; ²²Vairappan 2003; ²³Yajima, Nozaki y col. 1997), en este caso particular no se observó correlación ni con los diferentes FFA de manera individual ni con la suma de los mismos. Además, el contenido total de ácidos grasos con probada actividad antimicrobiana, como el C16:1, C18:2 o el C18:3, (³Benkendorff, Davis y col.

⁹ Un dendograma es una representación visual del proceso de agrupamiento jerárquico. Va agrupando a los distintos conglomerados de dos en dos hasta alcanzar un único grupo.

2005; ²⁴Ouattara, Simard y col. 1997) no produjo ninguna correlación con la actividad observada lo que sugiere un comportamiento más complejo y una fuerte contribución de otros lípidos y/o la inhibición de los efectos antimicrobianos de los ácidos grasos presumiblemente provocada por la presencia de colesterol en los extractos (⁵Galbraith, Miller y col. 1971).

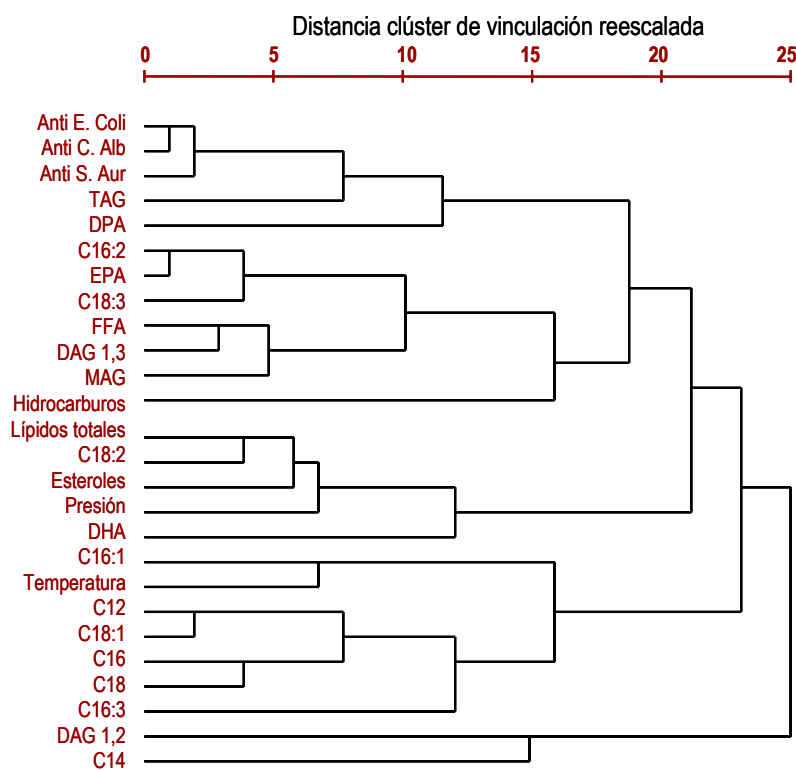


Fig. VI-7.- Dendrograma de las 26 variables estudiadas empleando el método de *average linkage*.

El análisis de componentes principales también se empleó para establecer relaciones entre la actividad antimicrobiana y la composición lipídica. Se obtuvieron 5 componentes principales que explicaban un 97,6% de la variación total de los datos. La rotación de los cinco componentes principales (empleando el método Varimax) proporcionó los siguientes resultados: el primer componente principal, que explicaba un 30% de la variación total, se correlacionó negativamente con C18 (-0,95), C18:1 (-0,95), C16 (-0,91) y C12 (-0,85). Mientras que el segundo componente (que explicaba un 25,2% de la variación total) estaba fuertemente correlacionado (positivamente) con la actividad anti *Staphylococcus aureus* (0,978), anti *Escherichia coli* (0,939), anti *Candida albicans* (0,939) y la concentración de DPA (0,822) y negativamente correlacionado con el contenido en TAG (-0,821) lo que confirma los resultados obtenidos por el análisis de clúster.

4. CONCLUSIONES

- ✖ En este estudio se demostró la capacidad del CO₂ en condiciones supercríticas para obtener extractos con actividad antimicrobiana de la microalga *Chaetoceros muelleri*.

- ✖ Los rendimientos de extracción obtenidos están fuertemente influenciados por la densidad de extracción. No obstante, debido a la pared celular de sílice que poseen las microalgas diatomeas, los rendimientos no superan el 4 ‰.
- ✖ Gracias al ensayo de actividad antimicrobiana realizado frente a diversos microorganismos, se comprobó que es posible conseguir extractos bioactivos empleando CO₂. Los extractos obtenidos son más activos frente a levaduras que frente a bacterias.
- ✖ Se analizaron los extractos mediante HPLC-ELSD para poder conocer el perfil lipídico siendo las fracciones más abundantes los ácidos grasos libres seguidos de los esteroides.
- ✖ Mediante GC-FID se caracterizaron los ácidos grasos presentes en los extractos (libres y esterificados), siendo la familia de los C16 la mayoritaria, pero contando con una importante presencia de ácidos grasos poliinsaturados.
- ✖ El análisis estadístico de los datos, considerando la composición lipídica y la concentración relativa de los ácidos grasos en los extractos sugirió importantes relaciones entre la actividad microbica y el contenido en triglicéridos y DPA.

5. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Chiou, S.Y., Su, W.W. y col. (2001). "Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture". Journal of Biotechnology 85(3): 247-257.
- 2.- Pernet, F., Tremblay, R. y col. (2003). "Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system". Aquaculture 221(1-4): 393-406.
- 3.- Benkendorff, K., Davis, A.R. y col. (2005). "Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties". Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 316(1): 29-44.
- 4.- Kabara, J.J., Vrible, R. y col. (1977). "Antimicrobial lipids: Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides". Lipids 12(9): 753-759.
- 5.- Galbraith, H., Miller, T.B. y col. (1971). "Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol". The Journal Of Applied Bacteriology 34(4): 803-813.
- 6.- Parrish, C.C., Wells, J.S. y col. (1999). "Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*". Marine Biology 133(3): 461-471.
- 7.- Birtigh, A., Johannsen, M. y col. (1995). "Supercritical-fluid extraction of oil-palm components". The Journal of Supercritical Fluids 8(1): 46-50.
- 8.- Hurtado-Benavides, A.M., Señoráns, F.J. y col. (2004). "Countercurrent packed column supercritical CO₂ extraction of olive oil. Mass transfer evaluation". The Journal of Supercritical Fluids 28(1): 29-35.
- 9.- Rodrigues, C.E.C., Reipert, E.C.D. y col. (2005). "Equilibrium data for systems composed by cottonseed oil + commercial linoleic acid + ethanol + water + tocopherols at 298.2 K". Fluid Phase Equilibria 238(2): 193-203.
- 10.- Abidi, S.L. (2001). "Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils". Journal of Chromatography A 935(1-2): 173-201.
- 11.- Elhamdy, A.H. & Christie, W.W. (1993). "Separation of Nonpolar Lipids by High-Performance Liquid-Chromatography on a Cyanopropyl Column". Hrc-Journal of High Resolution Chromatography 16(1): 55-57.

- 12.- **Schaefer, A., Kuchler, T. y col.** (2003). "Migration of lubricants from food packagings - Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection". Journal of Chromatography A 1017(1-2): 107-116.
- 13.- **Becart, J., Chevalier, C. y col.** (1990). "Quantitative-Analysis of Phospholipids by Hplc with a Light-Scattering Evaporating Detector - Application to Raw-Materials for Cosmetic Use". Hrc-Journal of High Resolution Chromatography 13(2): 126-129.
- 14.- **Guillard, R.R. & Ryther, J.H.** (1962). "Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran." Canadian Journal of Microbiology 8: 229-239.
- 15.- **Brunner, G.** (2005). "Supercritical fluids: technology and application to food processing". Journal of Food Engineering 67(1-2): 21-33.
- 16.- **Torres, C.F., Vazquez, L. y col.** (2005). "Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector". Journal of Chromatography A 1078(1-2): 28-34.
- 17.- **Sze, P.** (1986). A Biology of the Algae. London, England, WCB/McGraw-Hill Publishers.
- 18.- **Andrich, G., Zinnai, A. y col.** (2005). Kinetics of supercritical CO₂ extraction of bioactive oil from microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis*. ICheP-7 (The seventh Italian Conference on Chemical & Process Engineering), Taormina, Italy, Chemical Engineering Transactions.
- 19.- **Lim, G.B., Lee, S.Y. y col.** (2002). "Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction". Biochemical Engineering Journal 11(2-3): 181-187.
- 20.- **Borowitzka, M.A.** (1999). Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. Chemicals from microalgae. Z. Cohen. London, UK, Taylor & Francis: 313-352.
- 21.- **Skrivanova, E., Marounek, M. y col.** (2005). "Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C₂-C₁₈ fatty acids". Letters of Applied Microbiology 41: 77--81.
- 22.- **Vairappan, C.S.** (2003). "Bacterial dynamics associated with algal antibacterial substances during post harvest desiccation process of *Sargassum stolonifolium* Phang et Yoshida". Indian Journal of Experimental Biology 41(8): 837-845.
- 23.- **Yajima, M., Nozaki, K. y col.** (1997). "An antimicrobial fraction from the residue obtained by supercritical carbon dioxide extraction of *Capsicum* spp. for use in food preservation." Journal of Antibacterial and Antifungal Agents 25(3): 131-137.
- 24.- **Ouattara, B., Simard, R.E. y col.** (1997). "Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms". International Journal of Food Microbiology 37(2-3): 155-162.

VII. Conclusiones finales

1. CONCLUSIONES FINALES

1. Se ha llevado a cabo la optimación de la obtención de extractos de *Spirulina platensis* empleando fluidos sub- y supercríticos mediante la aplicación de un diseño experimental y el análisis estadístico de los datos. Los mejores resultados, en términos de rendimiento de los extractos, se obtuvieron empleando CO₂ y etanol a 78 bar y 55 °C, proporcionando estas condiciones un 8% de rendimiento. Cuando se empleó únicamente CO₂ puro, los rendimientos alcanzados fueron de un orden de magnitud menor. Asimismo se optimizó el enriquecimiento en vitamina E de los extractos, encontrándose su máximo a 220 bar y 83 °C, con un factor de enriquecimiento de 12 veces la concentración inicial.

2. Los extractos supercríticos de *Spirulina* se caracterizaron químicamente (empleando técnicas analíticas avanzadas) y funcionalmente (desde el punto de vista de sus actividades antioxidante y antimicrobiana). Los resultados más relevantes indicaron una mayor actividad antioxidante cuando los extractos se obtuvieron empleando CO₂ y etanol a presiones y temperaturas intermedias. Mediante HPLC-DAD y HPLC-MS/MS se determinó que los principales compuestos antioxidantes encontrados en los extractos eran carotenoides y que el empleo de modificadores favorecía la extracción de clorofilas y derivados de las mismas. Por otro lado, la actividad antimicrobiana, así como la composición de ácidos grasos, de los extractos resultó ser independiente de las condiciones de extracción, no obstante, la proporción de ácidos grasos de cadena larga se vio favorecida en los extractos precipitados en el primer separador.

3. Se ha optimizado, mediante la aplicación de un diseño experimental y el análisis estadístico de los datos, la obtención de extractos de *Dunaliella salina* empleando SFE. Los extractos obtenidos proporcionaron un elevado rendimiento y buenas actividades antioxidantes. Asimismo se cuantificaron, en los extractos, diferentes carotenoides, entre ellos, varios isómeros del β -caroteno. Se comprobó que la actividad antioxidante de los extractos estaba directamente ligada a la composición relativa entre estos isómeros, especialmente a la relación 9-cis/all trans- β -caroteno.

4. Se ha llevado a cabo el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Dunaliella salina* obtenidos por SFE, mostrando alguno de ellos una importante acción microbicida. Mediante GC-MS se han identificado varios compuestos que podrían ser responsables de esta actividad antimicrobiana como son β -ciclocitral, α - y β -ionona, fitol y los ácidos oleico, linoleico y palmítico. Además, en el extracto con mayor actividad antimicrobiana (310 atm, 9,8 °C) se detectó la presencia de un derivado indólico que no ha sido descrito previamente en *Dunaliella*, pero sí en otras microalgas de su género.

5. Se ha estudiado la capacidad del CO₂ en condiciones supercríticas para obtener extractos con actividad antimicrobiana de la microalga *Chaetoceros muelleri*. Los resultados mostraron una gran influencia de la densidad de extracción sobre los rendimientos obtenidos, aunque fueron relativamente bajos en todas las condiciones, debido a la pared celular que poseen las microalgas diatomeas. Mediante HPLC-ELSD y GC se pudo establecer un perfil lipídico de los extractos del que se desprende que su actividad antimicrobiana está directamente relacionada con su contenido en DPA y triglicéridos.

6. En resumen, en este trabajo se han demostrado las magníficas posibilidades del empleo de la extracción con fluidos supercríticos como técnica para la obtención de extractos con actividad funcional a partir de microalgas

7. La combinación de diversas técnicas avanzadas de análisis químico y el análisis funcional ha demostrado su validez para la caracterización de nuevos ingredientes alimentarios funcionales procedentes de microalgas que podrían ser utilizados por la industria alimentaria.

2. FINAL CONCLUSIONS

1. In this work, the optimization of sub- and supercritical fluid extraction of *Spirulina platensis* have been carried out by means of experimental design and statistical analysis of the data in order. In terms of yield, the best results were achieved using CO₂+ethanol at 78 bar and 55 °C, providing 8% of yield; when pure CO₂ was used, yields were an order of magnitude lowers. The enrichment of vitamin E in extracts was also optimized, reaching the maximum at 220 bar and 83 °C, which provides an enrichment of 12-fold the initial concentration.

2. Spirulina extracts were chemical (using advance analytical techniques) and functionally (from antioxidant and antimicrobial point of view) characterized. The main results pointed that higher antioxidant activity where achieved when CO₂ + ethanol were used at means pressures and temperatures. By means of HPLC-DAD and HPLC-MS/MS were found that the main antioxidant compounds in extracts were carotenoids and the use of polar modifiers increase the extraction rate of chlorophylls and its derivatives. Otherwise, the antimicrobial activity and fatty acid composition of extracts resulted being independent of extraction conditions, despite the ratio of long chain fatty acids were increased in extracts precipitated in firs separator.

3. By means of experimental design and statistical analysis it was optimized the use of SFE to obtain extracts of *Dunaliella salina*. The extracts provided a high yield and good antioxidant activities. Different carotenoids were quantified in the extracts, mainly isomers of β-carotene. It was proved that antioxidant activity of extracts were directly related to the relative composition of isomers, specially to the 9-cis/all trans-β-carotene ratio.

4. The antimicrobial activity of the *Dunaliella salina* supercritical extracts were studied finding an important microbicidal activity. By means of GC-MS the compounds that could be responsables of such activity were identified as β-ciclocitral, α- and β-ionona, fitol and the fatty acids oleic, linoleic and palmitic. Moreover, in the extract that presented the higher antimicrobial activity (310 atm, 9,8 °C) it was detected the presence of an indolic derivative which haven't previously described in Dunaliella, but in other microalgae of its gender.

5. It was studied the capacity of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri*. The results showed the great influence of extraction density in the obtained yields, being this yields relatively low in all conditions due to silicious cell wall that present diatom microalgae. By means of HPLC-ELSD and GC it could have been established a lipidic profile of extracts, since it can be concluded that antimicrobial activity is directly related with the content of DPA and triglycerides and inversely related with the cholesterol content.

6. As general conclusion, in this PhD work it have been demonstrated the good possibilities of supercritical fluid extraction as a tool to obtain new functional food ingredients from microalgae.

7. The combination of several advanced analytical techniques of chemical and functional analysis has demonstrated its validity to characterize new functional ingredients from microalgae suitable for the food industry.

VIII. Anexo 1

1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I-1.- Densidad, viscosidad y difusividad de diferentes fluidos tipo	5
Tabla I-2.- Propiedades críticas de las sustancias más comúnmente empleadas en condiciones supercríticas	6
Tabla I-3.- Solubilidad de ingredientes botánicos en CO ₂ supercrítico	8
Tabla I-4.- Ejemplos de antioxidantes dietéticos naturales cuya sinergia enzimática ha sido establecida	17
Tabla I-5.- Composición de ácidos grasos de <i>Spirulina platensis</i>	23
Tabla I-6.- Composición de vitaminas de <i>Spirulina platensis</i> , expresado en mg/kg	24
Tabla I-7.- Composición en aminoácidos de <i>Dunaliella salina</i>	25
Tabla I-8.- Composición de aminoácidos de <i>Chaetoceros muelleri</i> (gracilis) en porcentaje en peso del total de aminoácidos	28
Tabla I-9.- Algunas páginas web de interés relacionadas con la SFE y las microalgas, así como sus aplicaciones industriales	31
Tabla II-1.- Actividad biológica de los principales tocoferoles.	42
Tabla II-2.- Matriz del diseño experimental (compuesto rotativo de segundo orden con puntos de estrella) empleado en el presente trabajo de extracción supercrítica de <i>Spirulina platensis</i> .	47
Tabla II-3.- Distribución de pesos y rendimientos obtenidos en las extracciones realizadas empleando un 10% de etanol como modificador	50
Tabla II-4.- Distribución de pesos y rendimientos obtenidos en las extracciones realizadas empleando únicamente CO ₂ .	51
Tabla II-5.- Contenido de vitamina E (mg/g extracto) de los diversos extractos obtenidos en el separador 1 en las condiciones experimentales del diseño.	54
Tabla II-6.- Coeficientes de regresión, para los factores sin escalar, y valores estadísticos de su ajuste, obtenidos mediante MLR.	55
Tabla III-1.- Actividades antimicrobianas de los extractos supercríticos de <i>Spirulina platensis</i> .	71
Tabla III-2.- Distribución de ácidos grasos en los dos separadores de la extracción 1	72
Tabla III-3.- Valores de actividad antioxidante medida por el método de captura de radicales DPPH y expresada como EC50 en µg/mL	74
Tabla III-4.- Actividad antioxidante medida por el método de autooxidación del ácido linoleico medida a dos concentraciones diferentes para cada fracción, expresada junto con la desviación típica. Extracciones con CO ₂ y etanol.	75
Tabla III-5.- Actividad antioxidante medida por el método de autooxidación del ácido linoleico medida a dos concentraciones diferentes para cada fracción, expresada junto con la desviación típica. Extracciones con CO ₂ puro.	76
Tabla III-6.- Identificación tentativa de las familias de compuestos extraídos de la microalga <i>Spirulina platensis</i> (condiciones experimento 1) correspondiente a los cromatogramas de la Fig. III-16.	82
Tabla III-7.- Perfiles obtenidos por HPLC de los extractos realizados con CO ₂ y etanol	83
Tabla III-8.- Perfiles obtenidos por HPLC de los extractos realizados con CO ₂ puro	83
Tabla III-9.- Principales compuestos identificados con LC-MS y LC-MS/MS en las fracciones obtenidas en la extracción con fluidos supercríticos (220 bar y 55°C) de <i>Spirulina platensis</i>	84
Tabla IV-1.- Diseño factorial empleado para la obtención de antioxidantes de <i>Dunaliella salina</i> .	100
Tabla IV-2.- Rendimientos y actividades antioxidantes obtenidos en los extractos SFE de <i>Dunaliella salina</i>	101
Tabla IV-3.- Composición en carotenoides (expresada en mg de compuesto por 100 mg de extracto) de los extractos de CO ₂ de <i>Dunaliella salina</i> obtenidos en las condiciones de la Tabla IV-1.	104
Tabla V-1.- Actividades antimicrobianas de los diferentes extractos de <i>Dunaliella salina</i> .	118
Tabla V-2.- Perfiles de ácidos grasos de los extractos de CO ₂ de <i>Dunaliella salina</i> medidos por GC-MS: identificación, % área normalizada, y concentración	119
Tabla V-3.- Identificación mediante GC-MS de los compuestos de la fracción volátil	122
Tabla VI-1.- Condiciones experimentales empleadas para la obtención de extractos SFE de <i>Chaetoceros muelleri</i>	132
Tabla VI-2.- Gradiente de fases móviles empleado para el análisis de lípidos en extractos de <i>Chaetoceros muelleri</i>	132
Tabla VI-3.- Rendimientos de extracción obtenidos en las extracciones con CO ₂ de <i>Chaetoceros muelleri</i> a las diferentes condiciones estudiadas	134
Tabla VI-4.- Valores de actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de <i>Chaetoceros muelleri</i>	135

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. I-1.- Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT: punto triple, PC: punto crítico, Pc: presión crítica, Tc: temperatura crítica	5
Fig. I-2.- Variación de la densidad en función de la presión y temperatura en las cercanías del punto crítico. P_R , T_R y ρ_R son las variables reducidas ($P_R = P/P_C$, $T_R = T/T_C$ y $\rho_R = \rho/\rho_C$).	7

Fig. I-3.- Esquema básico de un extractor de fluidos supercríticos	10
Fig. I-4.- Distribución de las patentes sobre extracción supercrítica en Derwent Innovations Index en el periodo 1980-2006	11
Fig. I-5.- Diferentes fotografías de <i>Spirulina platensis</i> vista al microscopio	21
Fig. I-6.- Clorofila a, la única descrita hasta la fecha en microalgas del género <i>Cyanobacterium</i> .	21
Fig. I-7.- Núcleo tetrapirrólico extendido de la ficocianina.	22
Fig. I-8.- Primeros dibujos de <i>Dunaliella salina</i> , realizados por Hamburger en 1905 (¹⁰⁰ Oren, 2005).	24
Fig. I-9.- Diversas micrografías de <i>Chaetoceros</i> .	27
Fig. II-1.- Estructura de los dos principales estereoisómeros del α -tocoferol.	42
Fig. II-2.- Esquema de trabajo empleado para la optimización de la extracción	43
Fig. II-3.- Evolución de los componentes de la planta piloto de extracción con fluidos supercríticos con la que se ha realizado el presente trabajo (arriba; izquierda 1998, derecha 2006) y diagrama de flujo en el que se representa esquemáticamente el funcionamiento de dicha planta piloto.	45
Fig. II-4.- Comparación de los datos medidos por (²⁶ Joung, Yoo y col. 2001) frente a los datos predichos por dos ecuaciones de estado, Peng-Robinson (PR-EoS) y Multi-Fluid Nonrandom Lattice Fluid Hydrogen-Bonding (MF-NLF-HB-EoS) para el equilibrio CO ₂ -etanol a diferentes temperaturas.	48
Fig. II-5.- Evolución del rendimiento frente al tiempo de extracción, condiciones de extracción: 220 bar y 55°C, CO ₂ puro.	50
Fig. II-6.- Superficie de respuesta y diagrama de Pareto obtenido para el rendimiento en el separador 1 empleando CO ₂ y etanol (R ² =0,8882). La línea vertical indica el punto de significación estadística (P>0,05)	52
Fig. II-7.- Superficie de respuesta y diagrama de Pareto obtenido para el rendimiento en el separador 1 empleando únicamente CO ₂ (R ² =0,9706). La línea vertical indica el punto de significación estadística (P>0,05)	53
Fig. II-8.- Diagramas de Pareto obtenidos para el contenido en vitamina E de los diferentes extractos. La línea vertical indica el punto de significación estadística (P>0,10)	54
Fig. II-9.- Superficie de respuesta obtenida para la concentración de vitamina E (mg/g extracto) empleando únicamente CO ₂ .	56
Fig. III-1.- Esquema de trabajo del proceso empleado para la caracterización químico funcional de los extractos SFE de <i>Spirulina platensis</i> .	64
Fig. III-2.- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	66
Fig. III-3.- Ácido linoleico (arriba) y β -caroteno (abajo)	66
Fig. III-4.- Detectores de MS empleados en el presente trabajo: HP-1100-MSD de Agilent con interfase APCI (izquierda) y LCQ-DECA XP de Thermo-Fischer con interfase ESI (derecha)	70
Fig. III-5.- Cromatógrafo de Gases empleado en el presente trabajo	70
Fig. III-6.- Cromatogramas de la extracción 1 obtenidos por GC-FID, en la parte superior se puede ver la fracción correspondiente al separador 1 y en la inferior al separador 2	73
Fig. III-7.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar (éter de petróleo-acetona) para los extractos 1 a 10.	77
Fig. III-8.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar para los extractos 1 a 10 y revelada con DPPH 0,5 mM.	77
Fig. III-9.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar (tolueno-acetato de etilo-ác. fórmico) para los extractos 1 a 10.	77
Fig. III-10.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar para los extractos 1 a 10 y revelada con DPPH 0,5 mM	78
Fig. III-11.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar (éter de petróleo-acetona) para los extractos 11 a 20 y patrones comerciales de dos carotenoides, β -caroteno y luteína.	78
Fig. III-12.- Placa de TLC obtenida con la fase menos polar para los extractos 11 a 20 y revelada con DPPH.	78
Fig. III-13.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar (tolueno-acetato de etilo-ác. fórmico) para los extractos 11 a 20 y patrones comerciales de dos carotenoides, β -caroteno y luteína	79
Fig. III-14.- Placa de TLC obtenida con la fase más polar (tolueno-acetato de etilo-ác. fórmico) para los extractos 11 a 20 y revelada con DPPH	79
Fig. III-15.- Espectros UV-Visible, de las principales familias de compuestos encontrados en los extractos de <i>Spirulina platensis</i> : carotenoides (A y B), clorofilas (C) y compuestos fenólicos (D). Todos ellos han sido obtenidos con equipo de HPLC-DAD empleado en el presente trabajo HP 1090.	80
Fig. III-16.- Cromatogramas obtenidos en HPLC de la extracción 1. De abajo a arriba: separador 1 a 440 nm y 230 nm y separador 2 440 nm, 230 nm.	81
Fig. III-17.- Cromatograma obtenido con LC-APCI-MS del experimento 2, separador 1. Compuestos identificados: 1, Sifoneína; 2, Zeaxantina; 3, Mixoxantofila; 4, Astaxantina; 5, O-alomero de feofitina; 6, producto de degradación de Clorofila a; 7, Clorofila a; 8, β -caroteno y, 9, carotenoides sin identificar.	85
Fig. III-18.- Espectro de MS obtenido en el minuto 17 en el experimento 2, separador 1 (sup.) junto con los espectros de MS/MS obtenidos al fragmentar los iones de 887,5 m/z (inf. izq.) y 1796,5 m/z (inf. dch.)	87
Fig. IV-1.- Estructuras químicas de los principales carotenoides estudiados en el presente capítulo: α -caroteno, all-trans- β -caroteno, 15-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno y 9-cis- β -caroteno	95

Fig. IV-2.- Esquema de trabajo empleado para la optimación de la extracción	96
Fig. IV-3.- Reacción producida en el ensayo de actividad antioxidante empleado para medir la actividad de los extractos de <i>Dunaliella</i> .	97
Fig. IV-4.- Equipo de extracción supercrítica de escala analítica Suprex-Prepmaster (Thar designs, Pittsburg USA) y esquema de funcionamiento	99
Fig. IV-5.- Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de extracción con los efectos de cada término del modelo divididos entre su error estándar, $\alpha=90\%$, (izquierda) y superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción en función de la presión y la temperatura de extracción	102
Fig. IV-6.- Representación de los valores de rendimiento predichos por la Ecuación IV-2 y los valores reales observados	103
Fig. IV-7.- Cromatograma del extracto 7 adquirido a 450 nm (A) y zoom de la zona de isómeros del β -caroteno, minutos 21 a 27 (B). Identificación de los picos: 1, ϵ -caroteno; 2, α -caroteno; 3, 13-cis- β -caroteno; 4, alltrans- β -caroteno; 5, 15-cis- β -caroteno; y 6, 9-cis- β -caroteno	104
Fig. IV-8.- Representación de los valores de TEAC pronosticados por la Ecuación IV-3 y los valores reales observados	106
Fig. V-1.- Esquema de trabajo empleado para la obtención y caracterización antimicrobiana de los extractos de <i>Dunaliella salina</i> .	114
Fig. V-2.- Equipo de GC-MS empleado para el análisis de los extractos de <i>Dunaliella salina</i> (cortesía de la Dra. M ^a Victoria Moreno)	115
Fig. V-3.- Representación de las actividades antimicrobianas de los extractos de <i>Dunaliella salina</i> (datos ordenados por orden creciente de temperatura de izquierda a derecha)	118
Fig. V-4.- Perfil GC-MS de ácidos grasos obtenido tras derivatización de la muestra 10. Identificación de los picos como en la Tabla V-2	120
Fig. V-5.- Cromatograma de GC-MS de la fracción volátil del extracto 10. Identificación de los picos en Tabla V-3	123
Fig. VI-1.- Esquema de trabajo empleado para la caracterización antimicrobiana de los extractos supercríticos de <i>Chaetoceros muelleri</i> .	130
Fig. VI-2.- Representación de los rendimientos obtenidos por orden decreciente de densidad de extracción	134
Fig. VI-3.- Cromatograma obtenido con HPLC-ELSD del extracto de <i>Chaetoceros muelleri</i> obtenido a 200 atm y 80°C (Exp. 3)	136
Fig. VI-4.- Composición en familias de lípidos de los extractos SFE de <i>Chaetoceros muelleri</i> y de un extracto líquido-líquido (L-L). Nomenclatura: TAG: Trygliceridos; FFA: Ácidos Grasos Libres; 1,3-DAG's: 1,3-Diacilgliceroles; 1,2-DAG's: 1,2-Diacilgliceroles; MAG's: Monogliceridos	137
Fig. VI-5.- Cromatograma GC-FID de extracto 3 tras derivatización. Los rectángulos delimitan las zonas con la misma longitud de cadena de ácido graso	137
Fig. VI-6.- Distribución de ácidos grasos en los extractos SFE y un extracto líquido-líquido (L-L) de <i>Chaetoceros muelleri</i>	138
Fig. VI-7.- Dendograma de las 26 variables estudiadas empleando el método de average linkage.	139

IX. Anexo II: Publicaciones a las que ha dado lugar
esta tesis

1. Mendiola, J.A., Marin, F.R., Hernandez, S.F., Arredondo, B.O., Señoráns, F.J., Ibañez, E., Reglero, G. (2005) "Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga" *Journal of Separation Science* 28 (9-10), pp. 1031-1038.
2. Jaime, L., Mendiola, J.A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Senorans, F.J., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2005) "Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD" *Journal of Separation Science* 28 (16), pp. 2111-2119
3. J.A. Mendiola, C. Torres, A. Toré, P.J. Martín-Álvarez, S. Santoyo, B. O. Arredondo, J. Señoráns, A. Cifuentes, E. Ibañez (2007) "Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content" *European Food Research and Technology* 224 (4), pp. 505-510
4. Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., Señoráns, F.J. (2007) "Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*" *Food Chemistry* 102 (4), pp. 1357-1367
5. Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2007) "Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications" *Journal of Chromatography A* 1152 (1-2), pp. 234-246
6. Jaime, L., Mendiola, J.A., Ibañez, E., Martín-Álvarez, P.J., Cifuentes, A., Reglero, G., Señoráns, F.J. (2007) "β-carotene Isomer Composition of Sub- and Supercritical Carbon Dioxide Extracts. Antioxidant Activity Measurement" *Journal of Agricultural and Food Chemistry J. Agric. Food Chem.*, 55 (26)
7. Mendiola, J.A., García-Martínez, D., Rupérez, F.J. y col (2008) "Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE" *Journal of Supercritical Fluids* 43 (3), pp. 484-489

Jose A. Mendiola¹
 Francisco R. Marín¹
 S. Francisco Hernández²
 Bertha O. Arredondo²
 F. Javier Señoráns¹
 Elena Ibañez³
 Guillermo Reglero¹

¹Sección de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., CIBNOR, Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, BCS 23090, México

³Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga

Spirulina platensis microalga has been extracted on a pilot scale plant using supercritical fluid extraction (SFE) under various extraction conditions. The extraction yield and the antioxidant activity of the extracts were evaluated in order to select those extracts with both the highest antioxidant capacity and a good extraction yield. These extracts were characterized using LC coupled to diode array detection (DAD) and LC coupled to mass spectrometry (MS) with two different interfaces, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray (ESI) which allowed us to perform tandem MS by using an ion trap analyzer. The best extraction conditions were as follows: CO₂ with 10% of modifier (ethanol) as extraction solvent, 55°C (extraction temperature) and 220 bar (extraction pressure). Fractionation was achieved by cascade depressurization providing two extracts with different activity and chemical composition. Several compounds have been identified in the extracts, corresponding to different carotenoids previously identified in *Spirulina platensis* microalga along with chlorophyll a and some degradation products. Also, the structure of some phenolic compounds could be tentatively identified. The antioxidant activity of the extracts could be attributed to some of the above mentioned compounds.

Key Words: SFE; Antioxidants; *Spirulina platensis*; LC-DAD; LC-MS

Received: January 21, 2005; revised: March 17, 2005; accepted: March 26, 2005

DOI 10.1002/jssc.200500035

1 Introduction

In the last few years, there has been a growing interest in the development of functional foods because they can provide additional physiological benefits other than nutritional and energetic [1]. One of the most important trends is the incorporation of natural ingredients (vs synthetic), coming from natural sources (such as plants, spices, food by-products, or microalgae, among others), in traditional foods to obtain a functional food. In this sense, the microalga *Spirulina platensis* has been widely studied not only for its high protein and nutritional value [2], but also for its potential therapeutic properties; for example, several studies have shown that *Spirulina* or its extracts could prevent or inhibit cancer in humans and animals [3, 4] and recent publications have indicated that this species has immuno-promoting effects [5, 6]. Moreover, *Spirulina* contains a whole spectrum of natural mixed carotene and xanthophyll phytopigments, which, together with phycocyanin, seem to be related with its antioxidant activity [7–9].

Correspondence: Guillermo Reglero, Sección de Ciencias de la Alimentación, Facultad de Ciencias, Módulo C-XVI, Universidad Autónoma de Madrid, Carretera de Colmenar Km 15, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34 91 4978128. Fax: +34 91 4978255. E-mail: guillermo.reglero@uam.es.

New processes based on the use of environmentally friendly solvents, such as those that employ fluids under sub- and supercritical conditions (water, ethanol, and carbon dioxide), are receiving increasing attention because they provide benefits such as higher selectivity, shorter extraction times, and the possibility of maintaining the integrity of the sample, thus avoiding degradation reactions that could deteriorate the functional capacity of the extracts. In previous studies we demonstrated the usefulness of accelerated solvent extraction (ASE) with ethanol as solvent to isolate antioxidant compounds from *Spirulina platensis* [10]. Some authors have used supercritical CO₂ to separate and purify active components from *Spirulina*, such as carotenoids and γ -linolenic acid, and these extracts were compared with those performed by solvent extraction [11, 12]. Data published showed that SFE was easier and faster than solvent extraction for isolating compounds with pharmaceutical activity from algae; therefore, it was more effective and advantageous.

In the present work, supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethanol as modifier, under different experimental conditions, has been used to obtain antioxidant extracts from *Spirulina platensis* microalga. An exhaustive chemical characterization of the extracts with

the highest antioxidant activity has been performed to identify (at least tentatively) those compounds responsible for such activity. Different analytical techniques and methods have been used to gather the maximum information about the sample; thus, a combination of LC coupled to diode array detection (DAD) and mass spectrometry (MS) with two different interfaces (electrospray, ESI, and atmospheric pressure chemical ionization, APCI) has been employed.

2 Experimental

2.1 Samples and chemicals

The *Spirulina platensis* sample was supplied by Algamar (Pontevedra, Spain). The microalga was air-dried and was stored in the dark at room temperature until use.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity) and formic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Methanol of HPLC grade was purchased from Lab Scan (Dublin, Ireland), ethanol (99.5%) was from Panreac (Spain). Milli-Q water was obtained from a purification system (Millipore). CO₂ (N38) was from AL Air Liquide España (Madrid, Spain).

Carotenoid standards isolated from phytoplankton used in LC-DAD (β -carotene, zeaxanthin, myxoxanthophyll, β -cryptoxanthin and chlorophyll a) were from DHI Water & Environment (Hørsholm, Denmark).

2.2 Supercritical fluid extraction

The pilot-scale supercritical fluid extractor (Iberfluid, Spain) used in the present work has already been described elsewhere [13].

For each experiment, the extraction cell was filled with 75 g of *Spirulina* powder and 120 g of washed sea-sand (Panreac, Spain), and the cell was sealed in the extractor. Dynamic extractions were performed under the experimental conditions shown in **Table 1**. The extracts were fractionated by using two separation cells (S1 and S2) with independent control of temperature and pressure; fractionation pressures were set in the first separator (S1) at 50% of the extraction pressure and in the second separator (S2) at 50% of the first stage, with a maximum of 55 bar. The addition of ethanol started after having

reached the selected pressure and the flow rate was kept constant at 300 mL/h, that is, at 10% of the CO₂ flow rate (3 L/h). Extractions were performed in duplicate.

2.3 Antioxidant activity determination (in vitro assay)

Antioxidant activity was measured in all the extracts using a method based on a procedure described by Brand-Williams et al. [14] and modified by Herrero et al. [10]. Briefly, a solution was prepared by dissolving 23.5 mg of DPPH in 100 mL methanol and stored at 4°C. This stock solution was diluted 1:10 in methanol. Different concentrations of the extract solutions were prepared. Then 0.1 mL of these solutions was added to 1.9 mL of diluted DPPH solution to complete the final reaction medium (2 mL). The reaction was completed after 3 h at room temperature, and the absorbance was measured at 516 nm in a UV-Vis 6305 spectrophotometer from Jenway (Essex, England). Methanol was used to adjust the zero. The absorbance value was obtained by subtracting the blank absorbance measurement from the value given by the extract solution. A calibration curve was obtained that correlates the concentration of DPPH with the absorbance measured at 516 nm. For each extract five different concentration solutions were prepared in order to obtain the remaining DPPH concentration upon completion of the reaction. The use of these values allowed the estimation of the extract concentration necessary to achieve a 50% reduction of the initial DPPH concentration, i.e. EC₅₀ (Efficient Concentration, also called oxidation index). Measurements were performed in duplicate.

2.4 Pigment analysis by LC-DAD

The pigment composition of the supercritical extracts was analyzed by HPLC using a Varian Prostar System equipped with a DAD. The HPLC method is a modification of that described in [15]. The separation was carried out in a Novapack C₁₈ column 150 × 3.9 mm, 4 μ m particle size from Waters. The mobile phase was a mixture of solvent A (methanol:ammonium acetate 0.1 N; 7:3) and solvent B (methanol) at 0.9 mL/min according to a step gradient, lasting 35 min, which starting from 25%B, changing to 50% in one minute, rising up to 100% B at minute 10, then

Table 1. SFE conditions of *Spirulina platensis* microalga; extraction yields (%) and antioxidant activities (EC₅₀, μ g/mL).

Exp.	P_{ext}	T_{ext}	ρ_{ext}	P_{S1}	T_{S1}	ρ_{S1}	Yield S1	EC ₅₀ S1 (RSD)	P_{S2}	T_{S2}	ρ_{S2}	Yield S2	EC ₅₀ S2 (RSD)
1	360	55	887.54	180	55	732.55	0.84	168.1 (± 2.5) ^a	55	55	129.62	3.94	131.9 (± 6.1) ^d
2	220	55	780.59	110	55	415.75	0.63	66.6 (± 5.0) ^b	55	55	114.94	2.46	73.5 (± 2.2) ^b
3	80	55	203.51	40	55	76.64	7.94	111.8 (± 3.6) ^c	20	55	34.87	0.14	204.5 (± 3.3) ^e

P : pressure in bar; T : temperature in °C; ρ : density in kg/m³; ext: extraction cell; S1: separator 1; S2: separator 2.

^{a-e}: mean values with different superscripts implies that there are statistical significant differences among them ($p < 0.05$).

the mobile phase composition was kept constant until the end of the analysis. The sample extract was prepared by dissolving 10 mg in 1 mL of ethanol. Injection volume was 20 μ L. Identification of the pigments was performed, when possible, using standards. When no standards were available, tentative identification was based on UV-vis spectral characteristics and comparison with data appearing in the literature.

2.5 Phenolic compound analysis by LC-DAD

Extracts (concentration 10 mg/mL ethanol) were also analyzed to determine their content of phenolic compounds. Prior to their injection into the LC system, the extracts were filtered through a 0.45 μ m nylon membrane. A Varian ProStar system with DAD was used. Reversed phase chromatographic separation was performed with a Microsorb-MV C18 analytical column (250 \times 4.6 mm ID), with an average particle size of 5 μ m. The mobile phase was a mixture of solvent A (water/methanol/acetonitrile/acetic acid (15:2:2:1)) and B (acetonitrile) with a gradient profile of 100% (A) for 40 min and then changed to 20% (A) in 10 min and back to the initial conditions. The flow rate was 1 mL/min at 30°C. The absorbance changes were recorded at 280 nm. A tentative identification was undertaken based on the chromatographic behaviour and spectra characteristics of the corresponding chromatographic peaks.

2.6 LC-MS analysis

Two different analyses were performed by coupling LC to MS to provide complementary information: one analysis used an electrospray interface (ESI) and an ion trap analyzer (ITD) while the other used atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and a quadrupole.

In both systems, the separation was carried out using an HPLC apparatus with an autosampler (injection volume 5 μ L) equipped with a Zorbax XDB-C18 column 5.0 \times 2.1 mm, 5 μ m particle size. The mobile phase was a mixture of solvent A (methanol with 1% of formic acid) and solvent B (MilliQ water with 1% of formic acid) according to a step gradient that changed from 80% A to 100% A in 25 min and then is kept constant for another 30 min, at a flow rate of 0.2 mL/min.

In the APCI-MS System, a quadrupole Hewlett-Packard 1100 MSD was used. Detection was accomplished by using a diode array detection system (DAD), storing the signal at a wavelength of 440 nm. A personal computer system running Agilent Chemstation software was used for data acquisition and processing. UV-Vis signals were scanned in a range from 190 to 600 nm. LC/APCI-MS analyses were performed in the positive ion mode. The APCI parameters of the source were: capillary temperature, 150°C; vaporiser temperature, 335°C; corona needle

current, 4 μ A; sheath gas pressure (nitrogen), 35 psi. Ion monitoring mode was *full scan* in the range 100–1500 amu, which provides a complete mass spectrum for each analyte.

A second MS analysis was done, under the separation conditions mentioned above, using an LCQ-DQA XP from Thermo equipped with an ion trap. In the electrospray interface (ESI) method, the eluted compounds were mixed with nitrogen in the heated nebulizer interface and polarity was tuned to positive. Adequate calibration of ESI parameters (needle potential, gas temperature, nebulizer pressure) was required to optimize the response and to obtain a high sensitivity of the molecular ion. ESI conditions for positive ionization were as follows: source voltage 4.0 kV, sheath gas flow rate 29 au, capillary voltage 21 V, and capillary temperature 290°C. Tandem MS sequence analysis was performed on an LCQ Deca (Thermo-Finnigan) ion-trap mass spectrometer operating in the tandem MS mode. The collision energy was controlled at 32% with an activation time of 30 ms.

2.7 Statistical analysis

The statistical methods used for the data analysis were: One-way ANOVA, to examine the differences between samples due to the different extraction conditions tested; and Student-Newman-Keuls test to compare EC₅₀ means values. SPSS (version 12.01, SPSS Inc. 2002, Chicago, IL) for Windows was used for data processing. This program was run on a Pentium III personal computer.

3 Results and discussion

3.1 Supercritical fluid extraction of antioxidants of *Spirulina platensis*

In the present work, different supercritical conditions were tested to cover a wide range of extraction densities; also, fractionation of the extracts, by cascade depressurization in two separators (S1 and S2), was studied. CO₂ plus 10% ethanol was selected as extraction solvent based on previous results obtained in our laboratory (data not shown) and those achieved by other authors [12]. These authors, using an experimental design procedure, studied the optimal conditions for extracting carotenoids from *Spirulina pacifica* and concluded that the use of ethanol as modifier increases the recovery of such compounds. Table 1 shows the different experiments performed along with the extraction yields (as % w/w) and the antioxidant activity (as EC₅₀) in both separator 1 and separator 2; yields showed, on average, standard deviations of ± 0.3 percentile units. As can be seen, the highest extraction yield was achieved on working at the lowest extraction pressure (80 bar); under these conditions, a two phase mixture of liquid ethanol and supercritical CO₂ is used since the experimental conditions (pressure and temperature) are

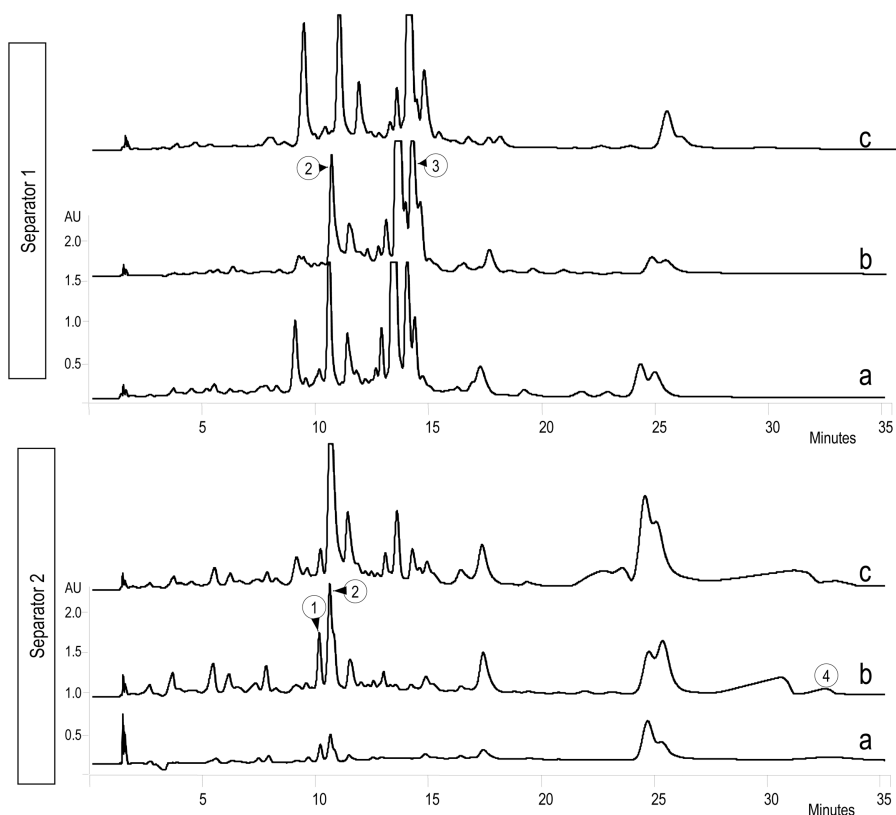


Figure 1. Chromatograms observed at 440 nm of fractions collected in separator 1 (top) and separator 2 (bottom) at different extraction conditions: (a) 80 bar, 55°C; (b) 220 bar, 55°C, and (c) 360 bar, 55°C. LC conditions: Novapack C₁₈ column 150 × 3.9 mm, 4 μm particle size; mobile phase: solvent A (methanol:ammonium acetate 0.1 N; 7:3), solvent B (methanol), gradient (35 min) starting from 25%B to 50% in one minute, rising up to 100% B at minute 10. Flow rate 0.9 mL/min. Identified compounds are: 1, Myxoxanthophyll; 2, Zeaxanthin; 3, Chlorophyll a; 4, β-carotene.

Table 2. Concentration (ppm) of some of the compounds identified in *Spirulina* supercritical extracts.

Compound	<i>t_r</i> [min]	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
		S1	S2	S1	S2	S1	S2
Myxoxanthophyll fucoside	9.8	47.7	59.0	19.8	52.9	75.6	5.4
Zeaxanthin	10.5	202.7	274.7	178.2	109.3	173.8	8.8
Chlorophyll a	14.3	285.8	208.0	480.1	55.0	394.9	n.d.
β-Carotene	32.7	n.d.	53.0	n.d.	55.0	n.d.	13.4

not sufficient to reach the one phase zone [16]. It seems that extraction with ethanol at enhanced fluidity (provided by the CO₂ gas) gives the highest efficiency in terms of extraction yields. When working under supercritical conditions, the yield increases with the extraction pressure, meaning that extracted compounds have a non polar nature. For antioxidant activity, statistical analysis showed that values obtained under different extraction conditions were significantly different from one another ($p < 0.05$) except those corresponding to experiment 2, separators 1 and 2, whose means were statistically equal. The lowest EC₅₀ (that is, the highest activity) was achieved under intermediate extraction pressures (that is, working at 220 bar and 55°C). Under these conditions, no significant differences in activity were observed between fraction 1 and fraction 2 (S1 and S2). On observing the chromatographic profiles shown in **Figure 1** it seems clear that a

few compounds are distributed in both separators but there are other compounds (mainly in the first part of the chromatogram, that correspond to more polar species) that are only found in separator 2. Identification of some pigments previously described in *Spirulina* was performed in the SF extracts by injecting standards and comparing both retention times and UV-Vis spectra. **Table 2** shows the quantification of such compounds (myxoxanthophyll, zeaxanthin, chlorophyll a, and β-carotene) in the supercritical extracts corresponding to S1 and S2.

Comparing the antioxidant activity of experiment 2, S1 and S2, similar results were obtained with values around 60–70 μg/mL. However, if we consider the differences observed in the chromatographic profiles and in Table 2, where quantification of the known compounds is presented, it seems reasonable to think that different types of

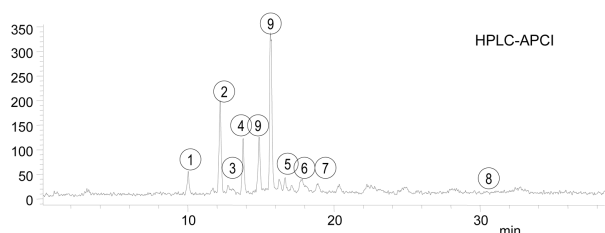


Figure 2. Total Ion chromatogram obtained in LC-APCI-MS of experiment 2, separator 1. LC conditions: Zorbax XDB-C18 column 5.0×2.1 mm, $5 \mu\text{m}$ particle size; mobile phase: solvent A (methanol with 1% of formic acid), solvent B (MilliQ water with 1% of formic acid), gradient changing from 80% A to 100% A in 25 min (30 min constant). Flow rate 0.2 mL/min. Identified peaks from Table 3 are shown. 1, Siphonein; 2, Zeaxanthin; 3, Myxoxanthophyll (confirmed by Hertzberg, 1969); 4, Astaxanthin; 5, Pheophytin a o-allomer; 6, Chlorophyll a degradation product; 7, Chlorophyll a; 8, β -carotene; 9, Unidentified carotenoids.

compounds and synergies between them probably contribute to the antioxidant activity of each fraction.

3.2 Characterization via LC-APCI-MS and LC-ESI-MS/MS of antioxidant extracts of *Spirulina*

Considering the above mentioned differences in antioxidant activity under the supercritical extraction conditions tested, experiment 2 (separators 1 and 2) was selected in order to chemically characterize antioxidant composition. Thus, an exhaustive analysis of these extracts was performed. As can be seen in Figure 1 (chromatograms corresponding to S1 and S2 of experiment 2), some of the identified compounds in the samples correspond to pigments previously identified in *Spirulina platensis* such as

zeaxanthin, β -carotene, chlorophyll a, and myxoxanthophyll.

In order to more exhaustively characterize the extracts, two different procedures based on LC-MS using two different interfaces (ESI and APCI) and ion analyzers (ITD and quadrupole) were used. ESI is more often used to ionize antioxidant molecules such as anthocyanins that are polar and exist as ions in aqueous solutions whereas APCI is commonly used for less polar and non-ionic antioxidants such as carotenoids [17]. Since we expect a very complex composition of *Spirulina* antioxidant extracts obtained by SFE, we decided to use both interfaces and analyzers to gain more information and to be able to unequivocally identify some of the major compounds present in the extracts. **Figure 2** shows the chromatographic profile of S1 corresponding to the signal for APCI-MS in positive ionization mode. Data obtained for the most important peaks seen in Figure 2 is shown in **Table 3** where retention times, UV spectra, and mass spectra (molecular ion and more abundant fragments, abundance higher than 20%) are given along with a tentative identification of each peak.

As can be seen in both Figure 2 and Table 3, several peaks were detected in *Spirulina platensis* supercritical extracts. All of them have been carefully analyzed in order to offer a profile of the most important constituents of the extracts which, in principle, contribute to the antioxidant activity of the fraction.

Those peaks with retention times of 10.3, 12.2, 12.7, 13.1, 14.9, 15.6, and 16.2 min have a UV-Vis spectra consistent with a carotenoid skeleton [18]. The peak at 10.3 min showed absorption maxima at 410, 455, and 480 nm, a

Table 3. Main compounds identified by LC-MS and LC-MS/MS of *Spirulina platensis* supercritical fluid extract (220 bar, 55°C).

t_r [min]	Max UV [nm]	M+H	Main fragments	Name
10.3	410, 455, 480	740	355, 371	Siphonein
12.2	420, 452, 475	569	445, 429	Zeaxanthin
12.7	420, 440, 470	751	589, 733	Myxoxanthophyll fucoside
13.1	475			Astaxanthin
13.7	415, 445, 470	536	519, 237, 503	Unidentified carotenoids
14.9	460	589	311, 371, 571	
15.6	460, 500	591	313, 335, 573	
16.2		593	313, 337, 575	
17.0	345, 390, 430	887	869, 609, 591	Pheophytin a O-allomer
18.2	345, 390, 430	893		Chlorophyll a
26.2 ^{a)}	409, 507, 599	871	593	Pheophytin a
30.8	420, 448, 478	537		β -Carotene
31.0 ^{a)}	411, 525, 598	813		Pyropheophytin a

^{a)} Compounds only found in separator 2.

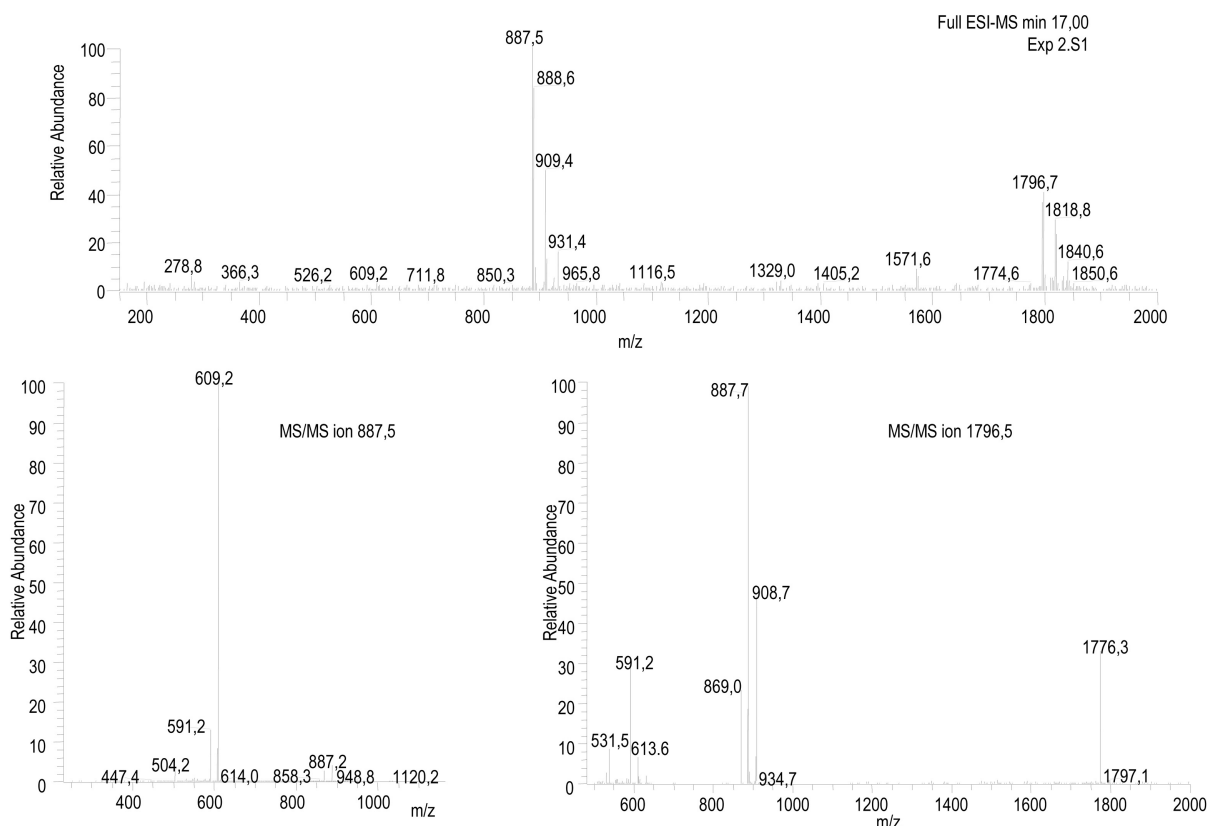


Figure 3. Full ESI-MS of the compound with retention time equal to 17 min. Tandem MS/MS for major fragments: 887.5 and 1796.5. Spectra corresponding to pheophytin-a o-allomer. LC conditions as in Figure 2.

ratio of relative absorption maxima III/II of 0.76, and m/z signals at 371 and 355. The UV-Vis spectrum is consistent with that of ketonic carotenoids with β -rings as end-groups, while the m/z signals are interpreted as fragments corresponding to half of the molecule (m/z : 371) and to the loss of 16 units corresponding to an hydroxyl moiety (m/z : 355), respectively. The aforementioned molecular characteristics could correspond to a carotenoid such as siphonein, whose presence has been previously reported in microalgae [19]. Furthermore, the isotopic distribution around the base peak (m/z : 371) seems to be compatible with the number of carbons of siphonein. Compounds corresponding to peaks at 12.2 and 12.7 min showed absorption maxima at 420, 452, and 475 nm and at 420, 440, and 470 nm, respectively, and a ratio of relative absorption maxima III/II of 0.90 and 0.95, which are consistent with a carotenoid skeleton with β -rings as end-groups. The peak at 12.2 min showed an m/z signal of 569 corresponding to the MW of zeaxanthin, whose absorption maxima fit those found for this peak. Moreover, the presence of zeaxanthin has been extensively reported in Cyanobacteria [19]. On the other hand, the second peak (12.7 min) showed m/z signals at 751, 733, and 589, which were previously described in [20] as myxoxanthophyll fucoside, which is a

carotenoid from Cyanobacteria [21]. The peak with retention time of 13.1 min showed a maximum of 475 nm which is consistent with carotenoids such as astaxanthin and cantaxanthin. However, only astaxanthin has been reported to be present in *Spirulina platensis*.

Other peaks, with retention times 14.9, 15.6, and 16.2 min, were also identified as carotenoids but a further tentative identification was not possible with the available data.

Figure 2 also displays several peaks between 16 and 20 min, all of them showing UV-Vis spectra corresponding to the chlorophyll skeleton [18]. They have been identified as chlorophyll a or chlorophyll degradation products such as pheophorbide a, pheophytin a, and pyropheophytin a. The presence of these compounds in the sample has been previously described [22] and can be attributed to allomerization, epimerization, demethylation, or pheophytinization reactions. Pheophorbide a has been identified by comparison with a standard prepared in the laboratory. The other degradation products were identified by comparison of UV-Vis spectra and their presence was confirmed by LC-MS, as shown in Table 3.

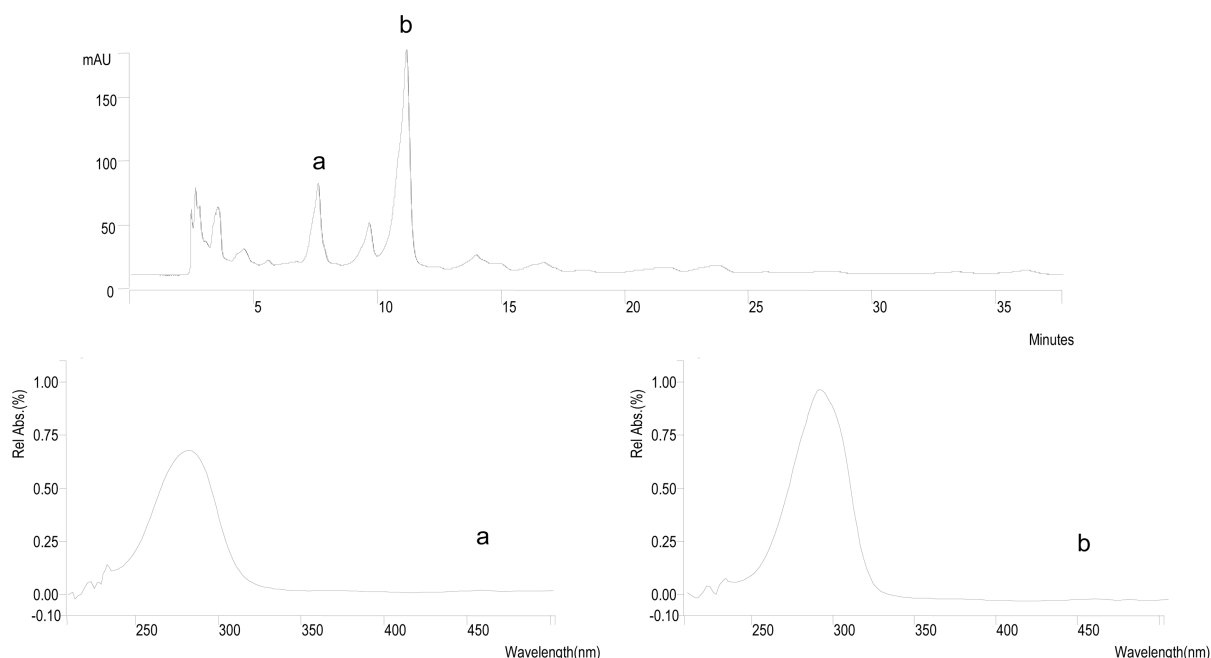


Figure 4. Partial chromatogram (from a 60 min long chromatogram) observed at 280 nm corresponding to experiment 2, separator 2. LC conditions: Microsorb-MV C18 column 250 × 4.6 mm, 5 μm particle size ; mobile phase: solvent A (water/methanol/acetonitrile/acetic acid (15:2:2:1)), solvent B (acetonitrile), gradient of 100% (A) for 40 min and then changed to 20% (A) in 10 min. Flow rate was 1 mL/min at 30°C.

Regarding the peaks tentatively identified as chlorophylls or chlorophyll degradation products, that with a retention time of 18.2 min showed absorption maxima (345, 390, and 430 nm) consistent with those of chlorophylls. Furthermore, the main signal in the mass spectrum (m/z : 893.5) fits the MW of chlorophyll a, which has been described as the only chlorophyll present in *Spirulina platensis*. The peak at retention time 17.0 min had the same absorption maxima; however, it showed m/z signals at 887, 869, and 609 with both APCI and ESI. This fragmentation pattern has been previously reported [23] as pheophytin a o-allomer. The use of ESI-MS/MS allowed, for example, unequivocal assignment of molecular ions and discrimination of the signals appearing in the full MS spectra which did not belong to the compound. One example of the potential of this technique for natural products such as pheophytin a o-allomer is shown in **Figure 3** where the full ESI-MS is presented along with the MS/MS of ion 887.5 and 1796.5

Besides, in separator 2, two more compounds were detected that did not correspond to any of those described above. When analysed by LC-APCI-MS, their retention times were 26.2 and 31.0 min with absorption maxima at 409, 507, and 599 for the first one, and 411, 525, and 598 nm for the second one. Regarding the m/z signals (Table 3), they are coincident with those previously reported for pheophytin a and pyropheophytin a [23].

In this sense, the presence of chlorophyll degradation products could be associated with the use of solvents, such as alcohols, that favor allomerization reactions. On the other hand, there is no evidence demonstrating that structural changes occurring in chlorophylls cause deterioration in their functional properties. On the contrary, the derivatives formed, mainly pheophytins, can preserve or even strengthen such properties [21].

3.3 Phenolic compounds from antioxidant extracts of *Spirulina*

As previously suggested, in the LC-DAD analysis performed in separator 2, the presence of some polar compounds was observed. These compounds showed a maximum around 280 nm that could correspond to phenolic compounds. In order to corroborate this hypothesis, a chromatographic method specially developed to analyze this type of compounds was used. **Figure 4** shows the chromatographic profile obtained for the analysis of *Spirulina* supercritical extract using the LC-DAD method corresponding to the analysis of phenolic compounds along with some typical spectra of the compounds detected. The extract corresponding to separator 2, experiment 2, showed peaks at 7.6, 9.7, 11.1, and 45.9 min with maxima at 278, 282, 288, and 292 nm, respectively. Their corresponding UV-Vis spectra are consistent with those of C₆–C₁ or C₆ phenolic skeletons [24] and account for 2.3; 1.6;

7.6; and 7.8%, respectively, of the total chromatographic area. Due to their spectral characteristics and chromatographic behaviour it may be suggested that peaks that elute early in the chromatogram may correspond to single C₆–C₁ or C₆ skeletons while the peak at 45.9 min, which elutes under less polar conditions, may correspond to a polymer based on the aforementioned structures. On the other hand, the extracts obtained under the same conditions but in separator 1 did not show any relevant peak. This difference can be due to the fractionation conditions in which compounds more soluble in CO₂ plus ethanol at lower densities are soluble thus precipitating preferentially in separator 2. The peak at 11.1 min was found in all the analysed samples being at the highest concentration (between 1.5- and 75-fold higher than in the rest of the samples, data not shown) in the extract corresponding to experiment 2, separator 2.

Although in the sample corresponding to experiment 2, separator 2, any compound could tentatively have been identified as a polyphenol, it is worth pointing out that in other samples (obtained using pure carbon dioxide as extracting agent) we could find a family of compounds whose UV-Vis spectra were consistent with flavonoid skeletons. Thus, a peak with retention time of 23.9 min and a maximum at 286 nm constituted a UV-Vis spectrum that may correspond to a flavanone skeleton, which is characterized by a single maximum at a wavelength between 275 and 295 nm and a shoulder between 300 and 330 nm [23]. This finding would be of a great interest because, to our knowledge, the presence of flavonoids has not been described in this kind of alga. However, further spectral analyses are needed to confirm its structure. Experiments are currently being conducted in our laboratory.

Acknowledgements

JAM thanks the Spanish Ministry of Education (MEC) for a FPI grant. The authors thank MEC (project: AGL2002-04621-C02-02) and CSIC/CONACYT (bilateral project: 2004MX0008) for financial support. The authors thank Chubby Vicente for her kind help in the acquisition of the MS spectra and for fruitful discussions.

References

- [1] I. Goldberg, *Designer foods, pharmafood, nutraceuticals*. Chapman and Hall, London 1996.
- [2] J.C. Dillon, A.P. Phuc, J.P. Dubacq, *World Rev. Nutr. Diet.* **1995**, *77*, 32–46.
- [3] A. Mittal, A. Kumar, A.R. Rao, *Pharm. Biol.* **1998**, *36*, 341–346.
- [4] J. Subhashini, S.V. Mahipal, M.C. Reddy, M. Mallikarjuna Reddy, A. Rachamalla, P. Reddanna, *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 453–462.
- [5] M.A. Qureshi, J.D. Garlich, M.T. Kidd, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **1996**, *18*, 465–476.
- [6] T. Hirahashi, M. Matsumoto, K. Hazeki, Y. Saeki, M. Ui, T. Seya, *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 423–434.
- [7] J.E. Piñero Estrada, P. Bermejo Bescós, A.M. Villar del Fresno, *Farmaco* **2001**, *56*, 497–500.
- [8] V.B. Bhat, K.M. Madyastha, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2000**, *275*, 20–25.
- [9] M.S. Miranda, R.G. Cintra, S.B. Barros, F.J. Manchini, *J. Med. Biol. Res.* **1998**, *31*, 1075–1079.
- [10] M. Herrero, E. Ibanez, J. Senorans, A. Cifuentes, *J. Chromatogr.* **2004**, *1047*, 195–203.
- [11] R.L. Mendes, B.P. Nobre, M.T. Cardoso, A.P. Pereira, A.F. Palavra, *Inorg. Chim. Act.* **2003**, *356*, 328–334.
- [12] M. Careri, L. Furlattini, A. Mangia, M. Musci, E. Anklam, A. Theobald, C. von Holst, *J. Chromatogr. A* **2001**, *912*, 61–71.
- [13] F.J. Señorans, E. Ibañez, S. Caverio, J. Tabera, G. Reglero, *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 491–499.
- [14] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm.-Wiss Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
- [15] F. Vidussi, H. Claustre, J. Bustillos-Guzmán, C. Cailliau, J.C. Marty, *J. Plankton Res.* **1996**, *18*, 2377–2382.
- [16] S.N. Joung, C.W. Yoo, H.Y. Shin, S.Y. Kima, K. Yoo, C.S. Lee, W.S. Huhc, *J. Fluid Phase Equil.* **2001**, *185*, 219–230.
- [17] R. Tsao, R. Yang, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1018*, 29–40.
- [18] S.W. Jeffrey, F.F.C. Mantoura, S.W. Wright, *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishing, Paris 1997.
- [19] Z. Cohen, *Chemicals from microalgae*. Taylor & Francis, London 1999.
- [20] S. Hertzberg, S. Liaaen-Jensen, *Phytochem.* **1969**, *8*, 1259–1280.
- [21] C. Van den Hoek, D.G. Mann, H.M. Jahns, *Algae. An Introduction to Phytology*. Cambridge University Press, Cambridge 1995.
- [22] K. Higashi-Okai, S. Otani, Y. Okay, *Cancer Lett.* **1998**, *129*, 223–227.
- [23] N. Chen, T.S. Bianchi, J.M. Bland, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **2003**, *67*, 2027–242.
- [24] K.R. Markham, *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London 1982.

Laura Jaime¹
 José A. Mendiola¹
 Miguel Herrero²
 Cristina Soler-Rivas¹
 Susana Santoyo¹
 F. Javier Señorans¹
 Alejandro Cifuentes²
 Elena Ibáñez²

¹Sección Departamental Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Madrid, Spain

²Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid, Spain

Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD

A new procedure has been developed to separate and characterize antioxidant compounds from *Spirulina platensis* microalga based on the combination of pressurized liquid extraction (PLE) and different chromatographic procedures, such as TLC, at preparative scale, and HPLC with a diode array detector (DAD). Different solvents were tested for PLE extraction of antioxidants from *S. platensis* microalga. An optimized PLE process using ethanol (generally recognized as safe, GRAS) as extraction solvent has been obtained that provides natural extracts with high yields and good antioxidant properties. TLC analysis of this ethanolic extract obtained at 115°C for 15 min was carried out and the silica layer was stained with a DPPH[•] (diphenyl-picrylhydrazyl) radical solution to determine the antioxidant activity of different chromatographic bands. Next, these colored bands were collected for their subsequent analysis by HPLC-DAD, revealing that the compounds with the most important antioxidant activity present in *Spirulina* extracts were carotenoids, as well as phenolic compounds and degradation products of chlorophylls.

Key Words: Antioxidant activity; HPLC-diode array detector; Pressurized liquid extraction; *Spirulina platensis*; TLC

Received: April 20, 2005; revised: May 9, 2005; accepted: May 9, 2005

DOI 10.1002/jssc.200500185

1 Introduction

Spirulina is one of the several alga genera that has attracted special attention due to its importance as human foodstuff and its *in vitro* and/or *in vivo* functional properties. Among this genus, *Spirulina platensis* has been extensively grown to obtain a protein-rich material of alimentary use, in populations of Africa and Mexico, or industrial use (blue pigments) [1]. In addition, *S. platensis* is a potential source of high-value compounds with functional properties, *e.g.* phycocyanins, carotenoids, phenolic acids, and ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids [2–5].

The growing interest in functional foods continues to raise the demand of new food ingredients obtained by extraction of natural products. In this way, several studies showed that *S. platensis* or its extracts could possess physiological advantages such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, or antitumoral properties [5–9]. Moreover, the use of synthetic antioxidants, such as BHT or BHA, has been called into question due to their suspected activity as promoters of carcinogenesis. Thus,

there is a great interest in finding new and safe antioxidants from natural sources [10, 11]. Opposite to plant extracts where antioxidant activity is mainly associated to phenolic compounds [12], carotenoids, phenolic acids, degradation products of chlorophyll, and phycocyanins have been isolated from *S. platensis* extracts, these substances being the possible active principles [4, 5, 13].

This interest in new functional foods (or nutraceuticals) from natural sources has generated the need of developing new analytical procedures able to both provide adequate extracts and characterize them from a biological (*e.g.* antioxidant activity) and chemical point of view in a fast and easy way.

At present, new extraction methods, such as supercritical fluid extraction (SFE) or pressurized liquid extraction (PLE), have been developed to overcome the well-known drawbacks of traditional methods (*e.g.* liquid–liquid extraction), such as long extraction times, laboriousness, low selectivity, and/or low extraction yields. Moreover, these traditional techniques employ large amounts of toxic solvents. On the other hand, while SFE is already frequently used as a clean technique to obtain functional compounds from natural sources, PLE still remains under study, being one of the most promising processes. These extraction techniques provide higher selectivity, shorter extraction times, and frequently do not require large amounts of toxic organic solvents [14] compared to tradi-

Correspondence: Dr. Elena Ibáñez, Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain. Fax: +34-915-644-853. E-mail: elena@ifi.csic.es.

Abbreviations: DAD, diode array detector; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate; PLE, pressurized liquid extraction

tional extraction processes. Extracts obtained by PLE are a mixture of several compounds; therefore, a separation–identification step is usually to be developed afterwards in order to adequately characterize them [15]. Among the different analytical procedures employed to analyze these fractions, MEKC and RP-HPLC, both coupled with diode array detection (DAD), have been mainly employed [16, 17]. This can be explained through their compatibility with the labile nature of some extracted compounds, and also, these techniques provide interesting advantages such as high sensitivity and reproducibility [16] for RP-HPLC and high efficiency and short analysis times for MEKC.

Independent of their advantages and drawbacks, it is evident that HPLC or MEKC does not provide straightforwardly the required information about the biological activity of the extracts obtained, as for instance their antioxidant activity. In this sense, TLC is considered a versatile and efficient technique for the separation and identification of pigments depending on their adsorption properties on chromatographic support (specially the R_f value). Furthermore, developed TLC plates can be stained with radical solutions (such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH[•]) or ABTS^{•+}) obtaining in that way the required information about antioxidant activity of the chromatographic bands [18, 19]. Such characteristics, together with its easy use, make this technique still widely applied [20].

The aim of this work was to develop an easy and fast method to investigate the compounds responsible for the antioxidant activity of *S. platensis* extracts. To do this, a complete analytical procedure is applied based on the following steps: (i) PLE is used to obtain fractions from *Spirulina* microalga; (ii) TLC is used to separate and determine the antioxidant activity of the different fractions; (iii) the bands with higher antioxidant activity are collected from preparative TLC plates; and (iv) RP-HPLC with DAD is employed to provide some initial information about the purity and nature of such collected bands. To our knowledge, this is the first time that such a complete procedure is applied to obtain and study fractions from natural origin.

2 Materials and methods

2.1 Samples

Microalgae samples (*S. platensis*, from Algamar, Pontevedra, Spain) consisted of air-dried microalgae with 6% moisture mass, stored under dry and dark conditions.

2.2 Chemicals

TLC plates (silica gel 60 F₂₅₄ on an aluminum backing) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). DPPH[•] (95% purity) was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Methanol, ethanol, petroleum ether (bp 40–60  C), and acetone were purchased from Panreac

Química (Barcelona, Spain), and hexane of HPLC grade was from Lab Scan (Dublin, Ireland).   -Carotene and lutein standards as well as ammonium acetate were provided by Fluka (Buchs, Switzerland).

Carotenoid standards isolated from phytoplankton used in LC-DAD (  -carotene, zeaxanthin, myxoxanthophyll,   -cryptoxanthin, and chlorophyll *a*) were from DHI Water & Environment (Hørsholm, Denmark).

2.3 PLE

Extractions of *S. platensis* were performed using an accelerated solvent extractor (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), equipped with a solvent controller. Three different solvents (*i. e.*, hexane, petroleum ether, and ethanol) were used to achieve extracts with different composition from a natural matrix. Moreover, extractions were performed at three different extraction temperatures (60, 115, and 170  C) and extraction times (3, 9, and 15 min). Previously, an extraction cell heat-up was carried out for a given time, which changed according to extraction temperature. All extractions were performed in 11 mL extraction cells, containing 2.5 g of sample.

Extraction method was performed according to the procedure described by Herrero *et al.* [15]. The extracts were covered with aluminum foil and stored at –18  C until dried. Solvents were removed under a stream of nitrogen gas. Afterwards, dry extracts were dissolved using the same solvent as used during extraction at 30 mg  mL^{–1} concentration. In the same way, the solutions were stored at –18  C and protected from light with aluminum foil.

2.4 TLC

Analytical-TLC was carried out in TLC plates (10 cm    20 cm) cut from the commercially available sheets. Twelve microliters of 30 mg  mL^{–1} extract solution was applied to 1 cm of the base of the silica gel layer and allowed to dry for a few minutes. Afterwards, the plate was eluted in a closed chamber with petroleum ether/acetone (75:25) as mobile phase (eluent 1). The staining of the silica layers with DPPH[•] radical was based on the procedure of Soler-Rivas *et al.* [19], with some modifications. The developed plate was placed upside down for 10 s in a 0.5 mM DPPH[•] solution in methanol. After this, the excess of solution was removed with a tissue paper and the layer was dried with a hair-dryer under cold air.

Preparative-TLC analysis was performed as follows: 300   L of *S. platensis* extract was carefully placed on the baseline of a 20 cm    20 cm TLC layer. Two different mobile phases were used in order to obtain a better separation of the bands according to their polarity: the first one corresponded to the same mobile phase as in the analytical-TLC (eluent 1) while the other consisted of a mixture of toluene/ethyl acetate/formic acid (50:40:10)

(eluent 2). In each experiment, two plates were used in parallel. One of the plates was stained with 0.5 mM DPPH[•] solution as described above, and those bands that showed antioxidant activity were scraped off from the second plate, eluted from the silica with either hexane (in the case of nonpolar carotenoids) or acetone or ethanol (if the polarity was medium), and filtered to remove the silica.

2.5 HPLC-DAD analysis

The scraped bands were analyzed by HPLC using a Hewlett-Packard HP 1090 Liquid Chromatograph equipped with a DAD. HPLC method has been published elsewhere [17]. The separation was carried out in a Novapack C₁₈ column 150 mm × 3.9 mm, 4 μm particle size from Waters. The mobile phase was a mixture of solvent A (methanol/ammonium acetate 0.1 N; 7:3) and solvent B (methanol) at 0.9 mL · min⁻¹ according to a step gradient, lasting 35 min, which started from 25% B, changing at 50% in 1 min, rising up to 100% B at minute 10; then, the mobile phase composition was kept constant until the end of the analysis. Total acquisition time was 35 min. Injection volume was 20 μL. The identification of the peaks was performed, when possible, using standards. When no standards were available, tentative identification was done based on UV-Vis spectra characteristics and comparing with data appearing in the literature.

2.6 Antioxidant activity determination (*in vitro* assay)

Antioxidant activity was measured in all the extracts using a method based on a procedure described by Brand-Williams *et al.* [21] and modified by Herrero *et al.* [15]. Briefly, a solution was prepared dissolving 23.5 mg of DPPH in 100 mL of methanol and stored at 4°C. This stock solution was diluted 1:10 in methanol. Different concentrations of the extract solutions were prepared. Then, 0.1 mL of these solutions was added to 3.9 mL of diluted DPPH[•] solution to complete the final reaction medium (4 mL). The reaction was completed after 4 h at room temperature, and the absorbance was measured at 516 nm in a UV-Vis 6305 spectrophotometer from Jenway (Essex, England). Methanol was used to adjust the zero. The absorbance value was obtained by subtracting the blank absorbance measurement from the value given by the extract solution. A calibration curve was obtained that correlates the concentration of DPPH[•] with the absorbance measured at 516 nm. For each extract five different-concentration solutions were prepared in order to obtain the remaining DPPH[•] concentration upon completion of the reaction. The use of these values allowed the estimation of the extract concentration necessary to achieve a 50% reduction of the initial DPPH[•] concentration, *i.e.* EC₅₀ (efficient concentration, also called oxidation index). Measurements were done in duplicate.

3 Results and discussion

3.1 PLE extracts from *S. platensis*

A screening of different PLE conditions (solvent, extraction time, and extraction temperature) was carried out in order to obtain different-composition extracts from *S. platensis* (see Table 1). The choice of the solvent is based on their different polarities (dielectric constants equal to 1.9 for hexane, 4.3 for petroleum ether, and 24.3 for ethanol) and therefore on their different ability to isolate various groups of compounds that can be responsible for the antioxidant activity of the extracts. Several extraction temperatures (60, 115, and 170°C; always considering that enough pressure is held to keep the solvents in a liquid state) and times (3, 9, and 15 min at medium temperature, *i.e.*, 115°C) were tested to study the effect of both factors in the extraction yield (*i.e.*, extraction efficiency) and in the degradation of the extracted compounds. Conditions tested were also selected based on previous results obtained in our laboratory [15]. As can be seen, the extraction yield increases by increasing the polarity of the solvent, it being maximum when working with ethanol (reaching up to 20%, given as dry weight); also, the higher the extraction time and temperature, the higher is the extraction yield, although the effect of the extraction time is almost negligible (at the evaluated conditions), as we have reported in a previous work where exhaustive optimization of PLE conditions was presented and discussed [22].

3.2 Analysis by TLC

The analytical-TLC of microalgae extracts shows different bands as can be seen in Fig. 1a (description of the bands as in Table 1). The main pigments in *S. platensis* microalga have been described [23, 24] as chlorophyll *a* and different carotenoids such as β-carotene, β-cryptoxanthin, zeaxanthin, echinenone, oscillaxanthin, and myxoxanthophyll. Thus, the orange, yellow, and green bands in analytical-TLC of Fig. 1 probably would correspond to some of these pigments. Analytical-TLC showed a strong orange band at *R_f* = 0.94, and an intense orange-yellowish band at *R_f* = 0.15. A yellow band (*R_f* = 0.91), probably an isomer of β-carotene, and more pale orange or orange-yellowish bands (*R_f* = 0.84, 0.72, and 0.27) were also found. Several authors have reported *R_f* values of different carotenoid compounds, using similar eluents, that seem to agree with our results [25, 26]. In these studies, β- and α-carotene bands were always found at the top of the TLC, and lutein/zeaxanthin (that elute with the same *R_f*) showed *R_f* values close to 0.2, whereas cryptoxanthin, asthaxanthin, and other xanthophylls presented variable middle *R_f* values depending on their esterification [25, 26]. In this way, β-carotene and lutein standards showed *R_f* = 0.94 and 0.15, respectively; thus, as zeaxanthin instead of lutein has

Table 1. PLE conditions (solvent, extraction time, and extraction temperature) of *S. platensis* microalga, extraction yields (%), and antioxidant activities ($\mu\text{g/mL}$). Some of the data have been taken from Reference [22]. Row number corresponds to their position in the analytical-TLC (Fig. 1)

Row	Solvent	Extraction temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Extraction time (min)	Yield (%)	Antioxidant activity EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	Petroleum ether	60	9	0.43	82.7
2		115	3	1.32	76.8
3		115	9	1.58	74.6
4		115	15	1.66	74.9
5		170	9	2.94	109.0
6	Hexane	60	9	0.5	82.7
7		115	3	1.43	74.7
8		115	9	1.76	73.1
9		115	15	1.77	72.9
10		170	9	4.28	110.3
11	Ethanol	60	9	7.28	98.8
12		115	3	12.33	84.8
13		115	9	11.54	86.5
14		115	15	11.94	89.2
15		170	9	19.70	100.1

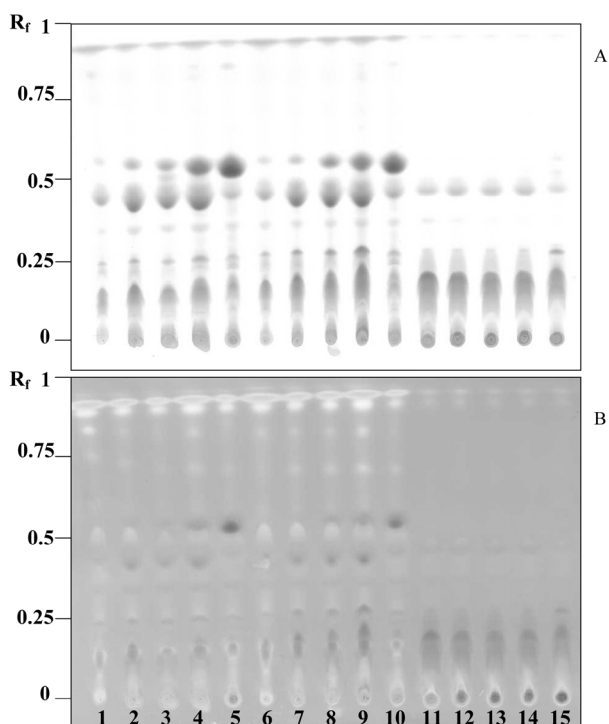


Figure 1. (a) Analytical-TLC of *S. platensis* PLE extracts; (b) analytical-TLC of *S. platensis* PLE extracts stained with 0.5 mM DPPH[•] solution.

been described in *S. platensis* microalgae, β -carotene and zeaxanthin are probably the pigments found in the PLE extracts. Furthermore, green wide bands were found close to the baseline.

The TLC results also showed differences in the composition of extracts with regard to the extraction conditions. Hexane and petroleum ether extracts showed a similar composition, a higher amount of carotenoids together with lower chlorophyll content, opposite to ethanol extracts behavior. Hexane and petroleum ether extracts showed two intense orange bands at $R_f = 0.94$ and 0.15 together with other orange-yellowish bands, whereas ethanol extracts showed slight orange bands at $R_f = 0.94$, 0.27 , and 0.15 and a deeper green band.

Moreover, dark gray-greenish bands were found in the middle of the analytical-TLC ($R_f = 0.54$ and 0.43) together with another slight gray-greenish band at lower R_f ($R_f = 0.35$). These bands might correspond to pheophytin-like compounds that come from the partial degradation of chlorophyll *a*. Quach *et al.* [27] reported that extraction methods with organic solvents that rely on high temperatures and/or prolonged periods of extraction result in some pigment degradation. Consequently, PLE caused a partial degradation of chlorophyll *a* because the loss of the magnesium ion from the chlorophyll ring resulted in the formation of the dark colored pheophytin at R_f values higher than that of the original chlorophyll *a*. Ethanol was the solvent that caused the lowest formation of pheophytin, whereas the extraction with hexane and petroleum ether led to similar chlorophyll degradation.

With regard to the other extraction conditions, pheophytin and chlorophyll bands enhanced on increasing extraction temperature (bands 1, 3, and 5 for petroleum ether, 6, 8, and 10 for hexane, and 11, 13, and 15 for ethanol); more-

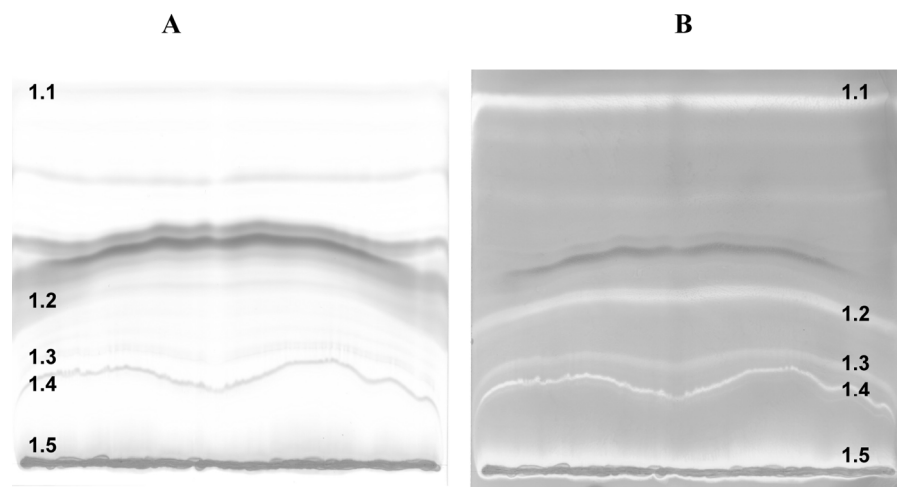


Figure 2. (a) Preparative-TLC of ethanol PLE extracts (115°C, 15 min); (b) preparative-TLC of ethanol PLE extracts (115°C, 15 min) stained with 0.5 mM DPPH* solution. Eluent 1: petroleum ether/acetone (75:25).

over, similar behavior was shown in relation to extraction time independent of the solvent used (bands 2, 3, and 4 for petroleum ether; 7, 8, and 9 for hexane; and 12, 13, and 14 for ethanol, all of them at 115°C and 3, 9, and 15 min, respectively).

As can be seen in Fig. 1b, stained silica plates with DPPH* radicals gave a purple background with bright yellow bands at the locations of those compounds which showed antioxidant activity. The intensity of the yellow color depended on the amount and nature of radical scavengers in the sample. Thus, orange, orange-yellowish, and yellow bands showed a brilliant yellow color after the analytical-TLC was dyed with 0.5 mM DPPH* (see Fig. 1b). The appearance of these vivid color lines implied that these bands showed radical scavenger capacity, as DPPH* radical (purple) turned out bright yellow (DPPH) in the presence of antioxidant compounds. Moreover, pheophytin-like compounds as a degradation product of chlorophyll *a* showed a slight antioxidant capacity. Extraction with hexane or petroleum ether at 115°C and 15 min yielded the more intense spots while ethanolic extracts showed a very intense spot at the origin, where sample was placed, indicating that the most active compounds in terms of antioxidant activity are relatively polar.

On the other hand, as shown in Table 1, antioxidant activity of hexane, ether, and ethanol extracts do not differ strongly from one another and the EC₅₀ values (efficient concentration) ranged from around 70 (for hexane and petroleum ether) to around 80 (μg/mL) for ethanol. Moreover, ethanol has a great advantage, compared to hexane and petroleum ether, since it is considered a GRAS solvent and therefore can be used as a safe solvent for the food industry. In addition, yields obtained with ethanol are the highest (as discussed above, see Table 1), providing a good efficiency of the extraction process and increasing the viability of the process on industrial scale.

Thus, the microalga extract obtained at 115°C and 15 min using ethanol as solvent was selected for preparative-TLC in order to further characterize the antioxidant compounds of *S. platensis* extracts. Furthermore, as mentioned above, in order to identify the more polar compounds (that seem responsible for the antioxidant activity of the ethanolic extracts), two different phases with complementary polarities have been used as eluents (eluents 1 and 2).

Preparative-TLC of ethanolic extracts (see Figs. 2a and 3a) yielded several distinct bands showing high antioxidant activity after staining with 0.5 mM DPPH* (Figs. 2b and 3b). These bands, namely 1.1–1.5 for eluent 1 (Fig. 2) and 2.1–2.3 for eluent 2 (Fig. 3), were recovered for their subsequent analysis by RP-HPLC-DAD. The bands were scraped off, eluted from the silica with either hexane, acetone, or ethanol (depending on their polarity), and filtered to remove the silica.

3.3 Analysis by HPLC-DAD

Ethanolic extract obtained under optimal conditions (115°C and 15 min) was also analyzed by HPLC-DAD to obtain a chromatographic profile of the compounds that are present in the whole extracts (Fig. 4). Only few of these compounds have antioxidant capacity and therefore preparative-TLC was used to isolate those bands able to react with the free radical DPPH*, as explained above. The scraped bands of the preparative-TLC were analyzed by HPLC-DAD, allowing a preliminary characterization of the compounds (Figs. 5 and 6) based on their retention time and UV-Vis spectra by comparison with standards, when available, or with data appearing in the literature and previous work done in our laboratory [17]. Figure 7 shows the UV-Vis spectra of the compounds that have been detected in the *Spirulina* extracts.

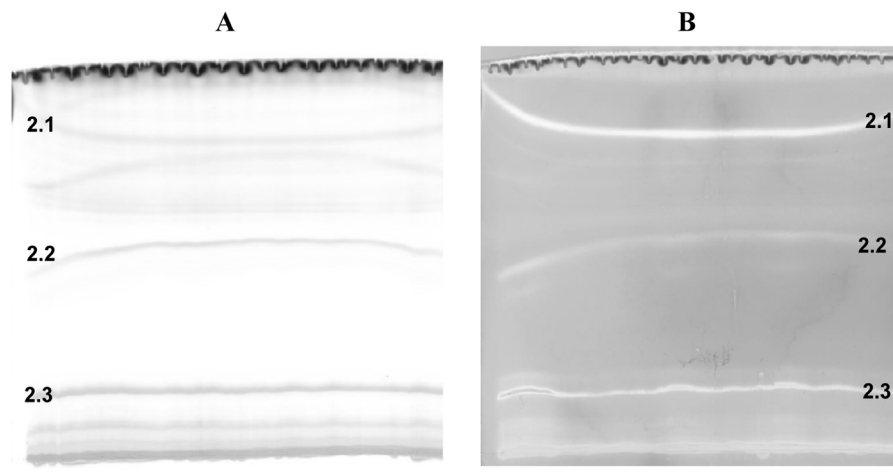


Figure 3. (a) Preparative-TLC of ethanol PLE extracts (115°C, 15 min); (b) preparative-TLC of ethanol PLE extracts (115°C, 15 min) stained with 0.5 mM DPPH* solution. Eluent 2: toluene/ethyl acetate/formic acid (50:40:10).

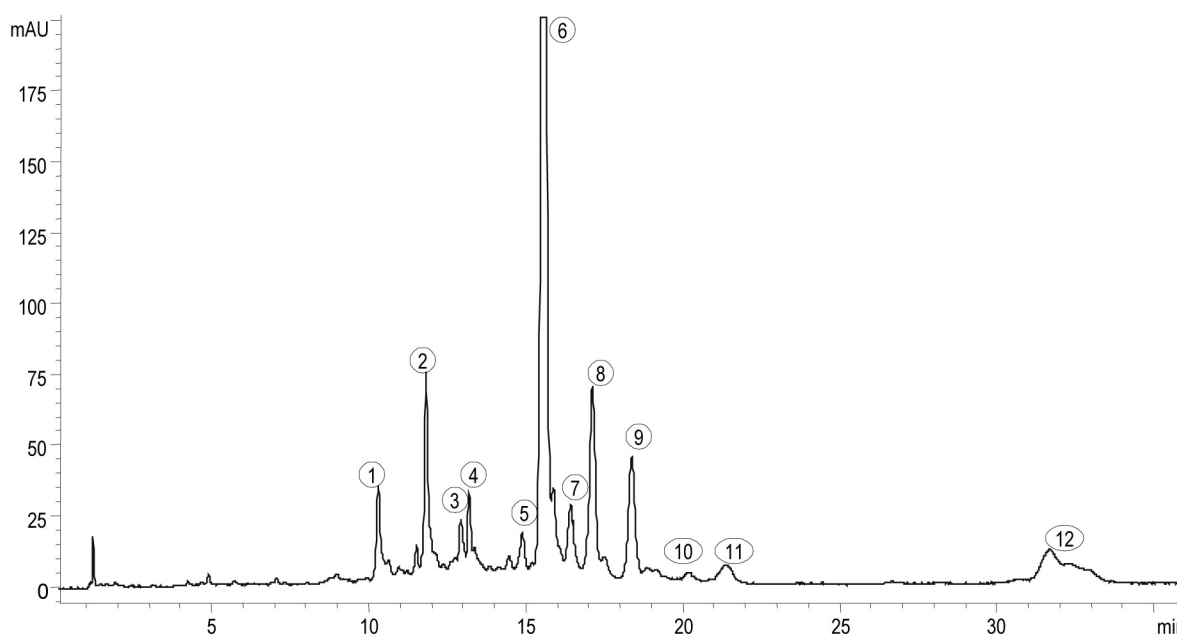


Figure 4. HPLC-DAD 440 nm chromatogram corresponding to the ethanol PLE extracts (115°C, 15 min). Chromatographic method: Novapack C18 column 150 mm \times 3.9 mm, 4 μ m particle size; mobile phase: solvent A (methanol/ammonium acetate 0.1 N; 7:3), solvent B (methanol), gradient (35 min) starting from 25% B to 50% in 1 min, rising up to 100% B at minute 10. Flow rate 0.9 mL/min; identification: unidentified polar carotenoid (1), zeaxanthin (2), unidentified carotenoid (3), myxoxanthophyll fuco-side (4), chlorophylls (5–9), unidentified carotenoids (10, 11), and β -carotene isomers (12).

Figure 5a–c shows the chromatograms corresponding to the bands 1.1, 1.2, and 1.4 isolated using eluent 1, which, as mentioned, has a lower polarity than eluent 2. As can be seen, different carotenoids are isolated with good selectivity in the different bands. For instance, Fig. 5a shows, as expected, the separation of β -carotene that eluted in the TLC with an R_f equal to 0.94; in this fraction other carotenoids (not identified) are separated along with β -carotene that corresponded to those eluting close to this compound in the TLC; although no complete identification of these peaks is possible, it is likely to assume that these compounds have a molecular structure very similar to that of β -carotene. Figure 5b and c shows the isolation of ze-

xanthin and an unidentified polar carotenoid, respectively. The unidentified polar carotenoid seems to have a structure derived from myxoxanthophyll with UV maxima at 450, 480, and 510 nm [28]. These carotenoids seem to contribute to the total antioxidant activity of the *Spirulina* extract, since they correspond to the bands that react with DPPH* with higher intensity. The other band (corresponding to 1.3) was also analyzed by HPLC but no information could be obtained from them probably due to the low concentration of these bands.

Bands corresponding to the fractions 2.1 through 2.3 (eluent 2) were analyzed by HPLC-DAD and the correspond-

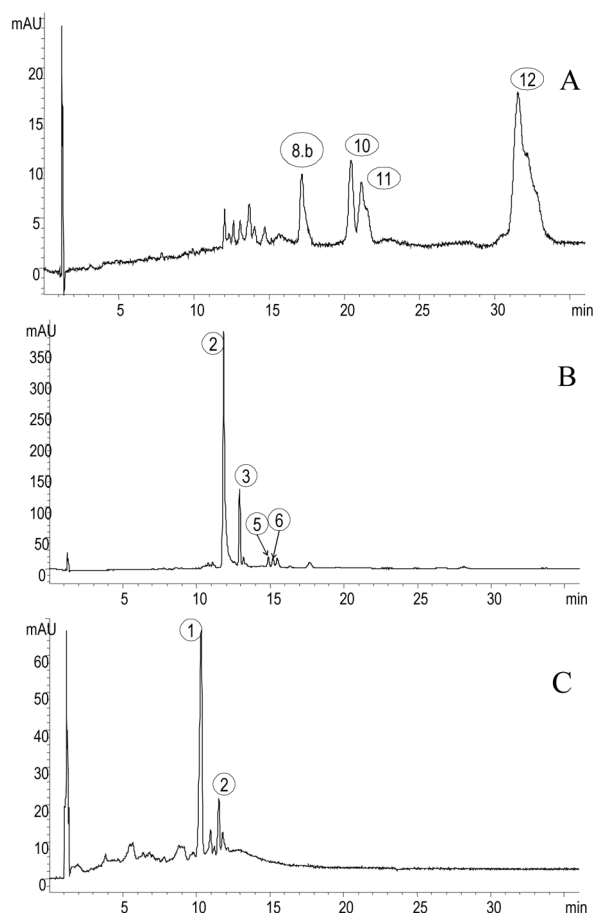


Figure 5. Chromatogram profile of scraped TLC bands with antioxidant activity (Fig. 2). LC conditions and identification as in Fig. 4 plus peak (8.b), unidentified carotenoid. Chromatograms a, b, and c correspond to TLC bands eluted with phase eluent 1; bands 1.1, 1.2, and 1.5.

ing chromatograms are shown in Fig. 6a–c. It is interesting to notice that the eluent 2 has a higher polarity, thus allowing a better separation and fractionation of band 1.5 (which remained close to the origin using eluent 1). As can be seen, chromatograms of the three major bands with antioxidant capacity scraped off after TLC with eluent 2 show the separation and isolation of zeaxanthin (Fig. 6a), unidentified polar carotenoid, probably a structure derived from myxoxanthophyll (Fig. 6b), and phenolic compounds (Fig. 6c) whose chromatogram is shown at 280 nm, which is the maximum wavelength for such a family of compounds. This fact confirms the presence of highly polar phenolic compounds (whose UV-Vis spectra are consistent with those of C₆-C₁ or C₆ phenolic skeletons [29]). These compounds appear as a colored blue band with R_f equal to 0.15. Further studies are conducted to obtain an unequivocal identification of the phenolic compounds found in the ethanolic extracts of *Spirulina*. This is of great importance considering that little is known about the presence of such compounds in *Spirulina*.

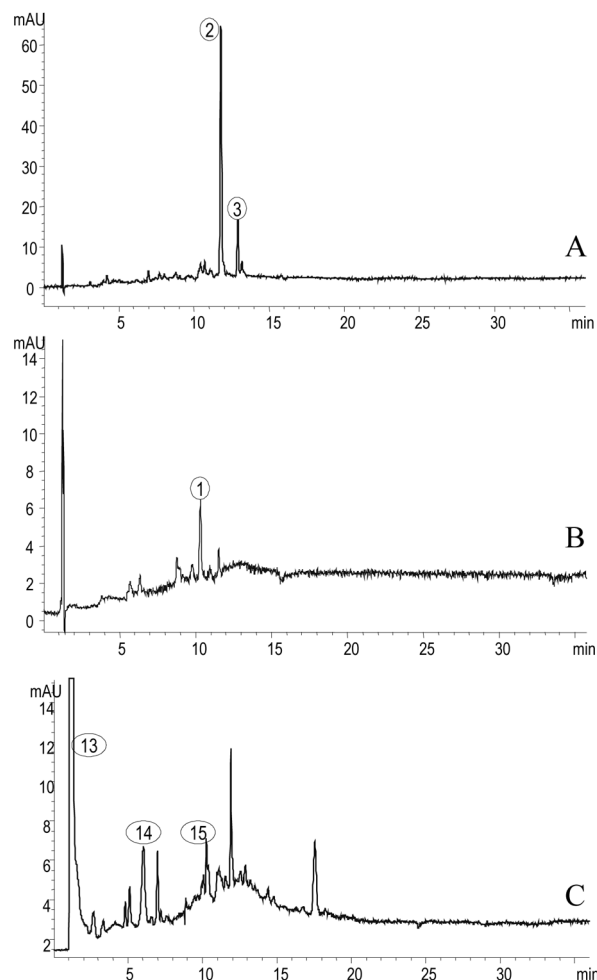


Figure 6. Chromatogram profile of scraped TLC bands with antioxidant activity (see Fig. 3). LC conditions and identification as in Fig. 4 plus peaks from (13) to (15), phenolic compounds. Chromatograms a, b, and c correspond to bands eluted with phase eluent 2; bands 2.1, 2.2, and 2.3. All chromatograms are shown at 440 nm except c that is given at 280 nm.

4 Concluding remarks

In this work, it has been demonstrated that the use of the combined protocol PLE-TLC-HPLC-DAD allows in a fast and simple way the extraction, purification, and preliminary characterization of several antioxidant compounds from *S. platensis* microalgae. Since the complete PLE-TLC-HPLC-DAD procedure once optimized takes less than 3 h, it is anticipated that this procedure will be applied to study other natural sources of functional ingredients with antioxidant activity.

J.A.M. and M.H. thank MCYT for FPI grants. Authors thank MCYT (project AGL2002-04621-C02-02) for financial support.

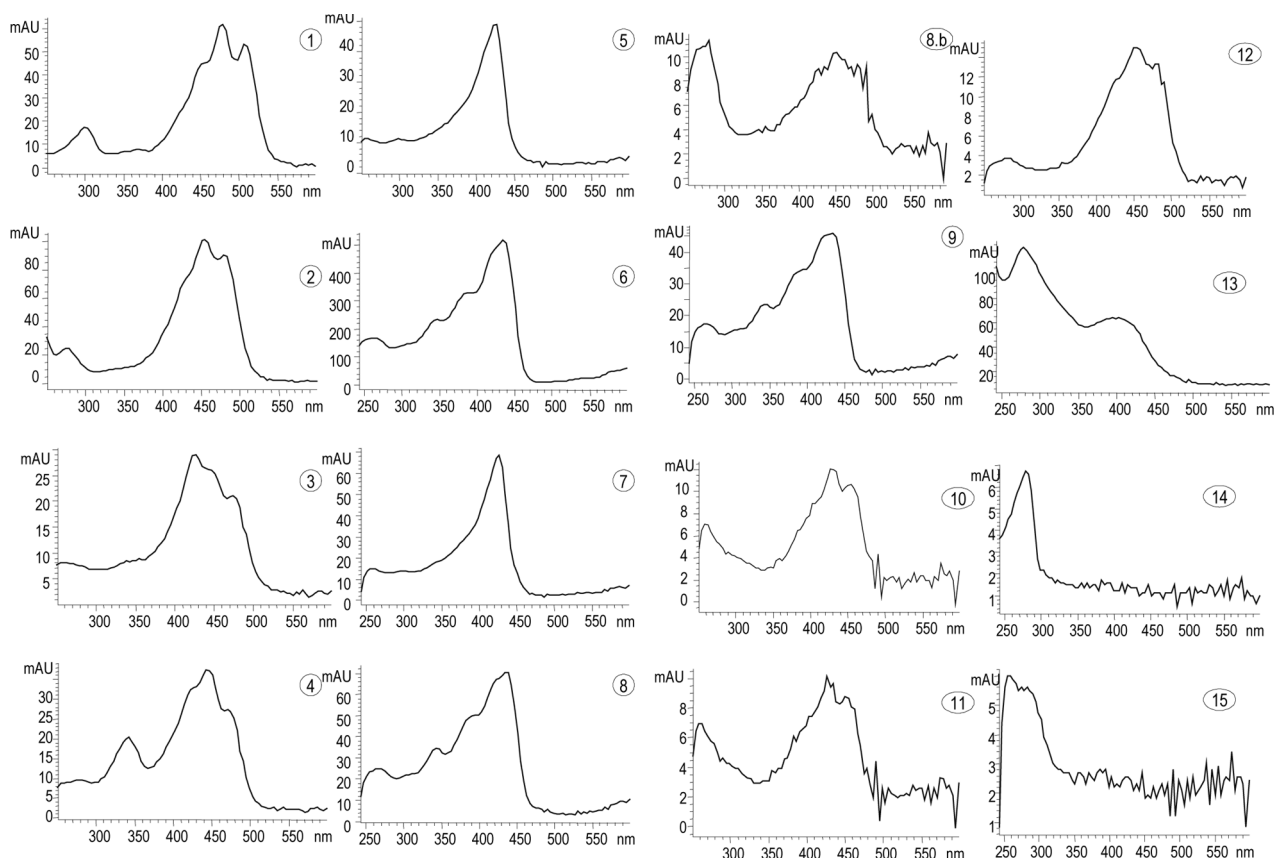


Figure 7. UV-Vis spectra of the compounds detected in the ethanol PLE extract. Numbers correspond to those in Fig. 4.

5 References

- [1] J. C. Dillon, A. P. Phuc, J. P. Dubacq, *World Rev. Nutr. Diet.* **1995**, *77*, 32–46.
- [2] M. Careri, L. Furlattini, A. Mangia, M. Musci, E. Anklam, A. Theobald, C. Holst, *J. Chromatogr. A* **2001**, *912*, 61–71.
- [3] R. L. Mendes, B. P. Nobre, M. T. Cardoso, A. P. Pereira, A. F. Palabra, *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *356*, 328–334.
- [4] M. S. Miranda, R. G. Cintra, S. B. M. Barros, F. J. Mancini, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1998**, *31*, 1075–1079.
- [5] J. E. Piñero-Estrada, P. Bermejo-Bescós, A. M. Villar-del Fresno, *Il Farmaco* **2001**, *59*, 497–500.
- [6] J. Subhashini, S. V. K. Mahipal, M. C. Reddy, M. M. Reddy, A. Rachamalla, P. Reddanna, *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 453–462.
- [7] T. Hirahashi, M. Matsumoto, K. Hazeki, Y. Saeki, M. Ui, T. Seya, *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 423–434.
- [8] G. Ozdemir, N. U. Karabay, M. C. Dalay, B. Pazarbasi, *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 754–757.
- [9] K. Hayashi, T. Hayashi, N. Morita, *Phytother. Res.* **1993**, *7*, 76–80.
- [10] M. Namiki, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1990**, *29*, 273–300.
- [11] J. Pokorny, *Trends Food Sci. Technol.* **1991**, *9*, 223–227.
- [12] W. Zheng, S. Y. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5165–5170.
- [13] M. C. Z. Demule, G. Z. Decaire, M. S. Decano, *J. Exp. Bot.* **1996**, *58*, 93–96.
- [14] J. W. King, *Food Sci. Technol. Int.* **2000**, *14*, 186–189.
- [15] M. Herrero, E. Ibáñez, J. Señorans, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047*, 195–203.
- [16] C. Simó, E. Ibáñez, F. J. Señorans, C. Barbas, G. Reglero, A. Cifuentes, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6648–6652.
- [17] J. A. Mendiola, F. R. Marín, S. F. Hernández, B. O. Arredondo, F. J. Señorans, E. Ibáñez, G. Reglero, *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1031–1038.
- [18] T. Takao, F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi, K. Sakata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1780–1783.
- [19] C. Soler-Rivas, J. C. Espín, H. J. Wichers, *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 330–338.
- [20] J. Sherma, *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 129–147.
- [21] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
- [22] M. Herrero, P. J. Martín-Álvarez, F. J. Señorans, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *Food Chem.* **2005**, *93*, 417–423.

- [23] C. Van den Hoek, D. G. Mann, H. M. Jahns, *Algae: An Introduction to Phycology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK 1995, pp. 12–13.
- [24] T. Gireesh, A. Jayadeep, K. N. Rajasekharan, V. P. Menon, M. Vairamany, G. Tang, P. P. Nair, P. R. Sudhakaran, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 447–449.
- [25] N. M. Sachindra, N. Bhaskar, N. S. Mahendrakar, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **2005**, *38*, 221–225.
- [26] T. Hodisan, C. Socaciu, I. Ropau, G. Neamtu, *J. Pharmaceut. Biomed.* **1997**, *16*, 521–528.
- [27] H. T. Quach, R. L. Steeper, G. W. Griffin, *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 385–387.
- [28] S. Hertzberg, S. Liaaen-Jensen, *Phytochemistry* **1969**, *8*, 1259–1280.
- [29] K. R. Markham, *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London 1982.

Jose A. Mendiola · Carlos F. Torres · Ana Toré ·
Pedro J. Martín-Álvarez · Susana Santoyo ·
Bertha O. Arredondo · F. Javier Señoráns ·
Alejandro Cifuentes · Elena Ibáñez

Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content

Received: 24 February 2006 / Revised: 5 April 2006 / Accepted: 6 April 2006 / Published online: 28 April 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Supercritical CO₂ extracts of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* (gracilis) have been investigated for their potential use as food preservatives, namely, as antimicrobials. A screening of different pressures and temperatures for supercritical CO₂ extraction was assayed in order to determine the main factors controlling the yield and antimicrobial activity of the extracts. Since the potential antimicrobial activity of these CO₂ extracts is mainly induced by the lipidic fraction, HPLC with evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) and GC with flame ionization detection (GC-FID) were used to identify lipid families and fatty acids, respectively. Antimicrobial activity of the extracts was measured against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Possible correlations between antimicrobial activity of extracts and their chemical composition were investigated, concluding that the total triglycerides and the DPA content seem to be the main parameters controlling the antimicrobial activity of the studied extracts.

Keywords *Chaetoceros muelleri* · Diatom microalgae · Supercritical CO₂ · SFE · Antimicrobial activity · HPLC-ELSD · Fatty acids · Correlation

J. A. Mendiola · C. F. Torres · A. Toré · S. Santoyo ·
F. J. Señoráns
Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación,
Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco,
28049 Madrid, Spain

P. J. Martín-Álvarez · A. Cifuentes · E. Ibáñez (✉)
Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC,
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain
e-mail: elena@ifi.csic.es
Tel.: +34-915622900
Fax: +34-915644853

B. O. Arredondo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.,
CIBNOR,
Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz,
BCS 23090 Mexico

Introduction

Diatom is a basic component of marine hatchery operations because it serves as alternative natural source of polyunsaturated fatty acids [1]. The diatom *Chaetoceros muelleri* is considered one of the most popular strains used for feeding shrimp larvae depending its composition mainly on the cultivation method. Triglycerides, polar lipids and free fatty acids are the main components of the lipid fraction when this *Chaetoceros muelleri* microalgae is cultured in batch [2].

The ability of fatty acids to interfere with bacterial growth and survival has been known for several decades [3]. Structure–function relationship studies on free fatty acids against human pathogenic bacteria indicate that antimicrobial activity can depend on both the chain length and the degree of unsaturation [4]. It has also been demonstrated that compounds, such as cholesterol, can antagonize the antimicrobial properties of fatty acids [5]. Consequently, both composition and concentration of free lipids can influence antimicrobial properties [3].

Supercritical fluid extraction is a well known technique to extract different types of lipids [6, 7], furthermore, extraction of polar lipids and free fatty acids can be improved by adding small quantities of ethanol [8].

The goal of the present investigation was the screening of the potential antimicrobial activity of supercritical extracts of *Chaetoceros muelleri* obtained under several extraction conditions. The effects of different temperature and pressure on the supercritical CO₂ yield were investigated. All extractions were done considering algae at the optimum cultivation conditions and the extracts were analyzed to determine the composition and concentrations of free lipids trying to correlate it with their antimicrobial properties.

Experimental

Cell culture

The microalgae *Chaetoceros muelleri* (CCMP1316) (CHGRA) was grown in batch cultures in f/2 medium [9] with addition of silicates. The culture was previously synchronized with three periods of 4 days each. Lighting ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was applied by Phillips tubes fluorescent in a 12:12 light–dark cycle, temperature and salinity were maintained at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and 35 PSU (practical salinity units), respectively. A continuous airflow was supplied to the cultures and pH remained between 7.5 and 8.2 by adding CO_2 . Under these conditions growth curves were previously determined for each microalgae by counting cells with a Neubauer chamber. Cells were harvested at late logarithmic phase of each treatment by centrifugation at 7000 rpm/min for 10 min, freeze-dried and maintained at -20°C until analyzed.

Supercritical fluid extraction

A Suprex PrepMaster (Suprex, Pittsburgh, PA, USA) supercritical fluid extractor was used for all the experiments. Sample (1 g of *Chaetoceros* dry weight basis mixed with 0.2 ml of ethanol, 99.5% Panreac, Barcelona, Spain) was placed into a 5 ml stainless-steel extraction cell. The supercritical CO_2 (N38 quality, AL, Air liquide España, Madrid, Spain) flow rate was controlled using a needle valve as variable restrictor. Total extraction time was 60 min; during the first 15 min extraction was static followed by 45 min of dynamic extraction. Extracts were collected in a glass vessel cooled by ice.

Different extraction pressures and temperatures were selected as variables to study the effect of the experimental conditions on the extraction yield obtained. Pressure was selected between 200 and 400 atm and temperature between 40 and 80°C . The different combinations (pressure–temperature of CO_2) provided medium-high extraction densities from 0.6 to 0.96 g/ml; this range of conditions has been suggested previously to extract non-polar compounds from different materials [10].

Lipid composition analysis

Lipid fraction of extracts was analyzed using two chromatographic techniques. Liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD), to identify the different lipid classes, and gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID) to identify the free and esterified fatty acids.

HPLC-ELSD

The analyses were done on a Kromasil silica 60 column (250 mm \times 4.6 mm, Análisis Vínicos, Tomelloso, Spain)

coupled to a CTO 10A VP 2 oven, a LC-10AD VP pump, a gradient module FCV-10AL VP, a DGU-14A degasser, and a evaporative light scattering detector ELSD-LT from Shimadzu (IZASA, Spain). Details of the chromatographic method used to analyze the products of the extraction are described elsewhere [11]. All HPLC solvents were HPLC purity from Labscan (Dublin, Ireland).

GC-FID

To prepare ethyl esters of free and esterified fatty acids, samples were mixed with chloroform/ethanol 2/1 (v/v) and ethylated by addition of 1 ml of a solution of sulfuric acid in ethanol (0.9 M). This mixture was allowed to stand overnight at 50°C . After addition of 200 μl miliQ water, the resulting mixture was extracted with two 1 ml portions of *n*-hexane and the final extract was then dried with sodium sulfate.

One microliter of derivatized sample was injected into a Perkin-Elmer autosystem XL (Wellesley, MA, USA) gas chromatograph with a 30 m BTR-Carbowax column (0.25 mm i.d.). Injector and detector temperatures were set at 220 and 230°C , respectively. The temperature program was as follows: starting at 100°C and then heating to 180°C at $20^\circ\text{C}/\text{min}$; followed by heating from 180 to 220°C at $15^\circ\text{C}/\text{min}$. The final temperature (220°C) was held for 30 min. Identification of the ethyl esters of the various fatty acids was based on a menhaden oil fish standard (#4-7085) obtained from Supelco (Bellefonte, PA).

Antimicrobial activity measurement

Microbial strains

The extracts were individually tested against a panel of microorganisms including two bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 11775) and one yeast (*Candida albicans* ATCC 60193). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains stock cultures were kept on nutrient agar at 4°C . *Candida albicans* was kept on Sabouraud dextrose agar at 4°C .

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal and fungicidal concentration (MBC)

A broth microdilution method was used, as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), for determination of the minimum inhibitory concentration [12]. All tests were performed in Mueller-Hinton broth supplemented with 0.5% Tween 20 (Fluka, Germany), with the exception of yeasts (Sabouraud dextrose broth + 0.5% Tween 20). The inocula of bacterial strains were prepared from overnight Mueller-Hinton broth cultures at 37°C . Yeasts were cultured overnight at 25°C in Sabouraud dextrose broth. Test strains were

suspended in Muller-Hinton (bacteria) or Sabouraud dextrose (yeasts) broth to give a final density 10^7 cfu/ml. The *Chaetoceros muelleri* extract dilutions in DMSO ranged from 10 to 200 mg/ml.

The 96-microwell plates were prepared by dispensing into each well: 165 μ l of culture broth, 5 μ l of inoculums and 30 μ l of different extracts dilutions. The final volume of each well was 200 μ l. Plates were incubated for bacteria and yeasts at 37 and 25 °C for 24 and 48 h, respectively. Negative controls were prepared using 30 μ l of DMSO (dimethylsulfoxide), the solvent used to dissolve microalgal extracts. Chloramphenicol and amphotericin B (Sigma, Madrid) were used as positive reference standards to determine the sensitivity of the microbial species used. After incubation, the MIC of each extract was determined by visual inspection of the wells bottom (bacterial growth was indicated by the presence of a white “pellet” on the well bottom). The lowest concentration of the extract that inhibited growth of the microorganism, as detected as lack of the white “pellet”, was designated the minimum inhibitory concentration. The minimum bactericidal and fungicidal concentration was determined by making subcultures from the clear wells that did not show any growth. Each test was performed in triplicate and repeated twice.

Statistical analysis

The statistical methods used were cluster analysis (Average Linkage method from standardized variables) to discover natural groupings of the variables and principal component analysis (PCA) from standardized variables to examine the relationship among them. Statgraphics program for Windows release 5.1 (StatPoint Inc., VA, USA) was used for data processing.

Results and discussion

Supercritical fluid extraction

Different extraction conditions have been studied in the present work to obtain extracts with antimicrobial activity. The experimental conditions using supercritical CO₂ and their corresponding extraction yields are shown in Table 1. As can be seen, yields were ranging from 1.8 to 3.9% under these conditions. Although different pre-treatments of the microalga using ultrasounds and microwaves were tested to increase these extraction yields, no significant improvements were obtained. A possible explanation for these low yields can be related to the siliceous cell wall of *Chaetoceros muelleri* [13] that, in fact, can preclude the diffusion of the supercritical extractant inside the cell. Even considering these low yields, an initial trend can be observed; extract 3 (obtained at 200 atm and 80 °C) showed the lowest yield while extract 2 (obtained at 400 atm and 40 °C) gave the highest and these values correlate with the minimum and maximum CO₂ density, respectively, as can be seen in Table 1. These results are also in agreement with

Table 1 Experimental conditions for the supercritical extracts and their corresponding yields from *Chaetoceros muelleri*

Extract number	Extraction pressure (atm)	Extraction temperature (°C)	CO ₂ density (g/ml)	Yield %
1	400	80	0.83	3.4
2	400	40	0.96	3.9
3	200	80	0.60	1.8
4	200	40	0.84	2.6
5	300	60	0.83	2.2

data obtained by other authors extracting different components from microalgal matrices [14, 15]. In spite of these low yields, the antimicrobial activity of these extracts was studied based on the huge interest that nowadays exists on new natural sources of food preservatives and nutraceuticals [16, 17].

Antimicrobial activity

Different microbial species, including a gram negative bacteria (*Escherichia coli*), a gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and a yeast (*Candida albicans*), were used to screen the potential antimicrobial activity of supercritical extracts from *Chaetoceros muelleri*. Their antimicrobial activity was quantified measuring their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal and fungicidal concentration (MBC). Results obtained are given in Table 2, showing that *Candida albicans* was the most sensitive microorganism to these extracts since the lowest concentration of extract was needed to kill this microorganism (lowest MBC values), compared to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* which needed a higher concentration (higher MBC values). Comparing the results obtained for the different extracts, the most active ones were 2, 3 and 5, followed by 1 and 4 (see Table 2). These results show that the use of medium values of pressure and temperature provides higher extraction of antimicrobial compounds. Moreover, the use of extreme pressure and temperature values (400 atm and 80 °C) gave less active extracts (experiment 1 in Table 2). This behavior is difficult to explain due to the complexity of the extracts obtained, since depending on the

Table 2 Minimum bactericidal concentration (MBC, given as mg extract/ml and μ g of antibiotic/ml) of different *Chaetoceros muelleri* extracts against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*

Extract number	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	15	15	9
2	12	12	7
3	12	12	7
4	15	17	9
5	12	12	7
DMSO extract	25	25	22
Reference antibiotic	10	10	100

extraction conditions, different compounds can be enriched in the extracts thus providing diverse interactions/synergies among them. Interestingly, the results of Table 2 also show that, in general these extracts possess a good antimicrobial activity and that they could be useful for the food industry.

A liquid–liquid extract of raw microalga using DMSO was obtained for comparing its antimicrobial activity with those obtained using supercritical CO₂. The results show (see Table 2) that the antimicrobial activity of the DMSO extract was about threefold lower than the obtained with the supercritical CO₂ extracts. This indicates that the use of supercritical CO₂ is more suitable to extract compounds with antimicrobial activity from *Chaetoceros*. Besides, some other additional advantages of using CO₂ have to be taken into account; namely, supercritical CO₂ extraction is an environment-friendly procedure and the achieved extracts can be directly used by the food industry as no toxic solvents are present (in opposition to classical liquid–liquid extraction).

Lipid composition of extracts

In an attempt to identify compounds responsible for the antimicrobial activity of these *Chaetoceros muelleri* supercritical extracts and based on the well-known ability of different fatty acids to inactivate microorganisms [3], different families of lipids were analyzed [11]. Figure 1 shows a typical HPLC-ELSD chromatogram of one of the supercritical extracts of *Chaetoceros muelleri* (experiment 3 in Table 1, 200 atm, 80 °C). As can be seen, a nice separation of the different lipid families found in the *Chaetoceros* extract is obtained, in which compounds such as triglycerides (TAG), diglycerides (DAG), monoglycerides (MAG), sterols, free fatty acids (FFA) and hydrocarbons were detected.

A comparison of the lipid composition of the five CO₂ extracts of Table 1 and a raw microalgae extract obtained

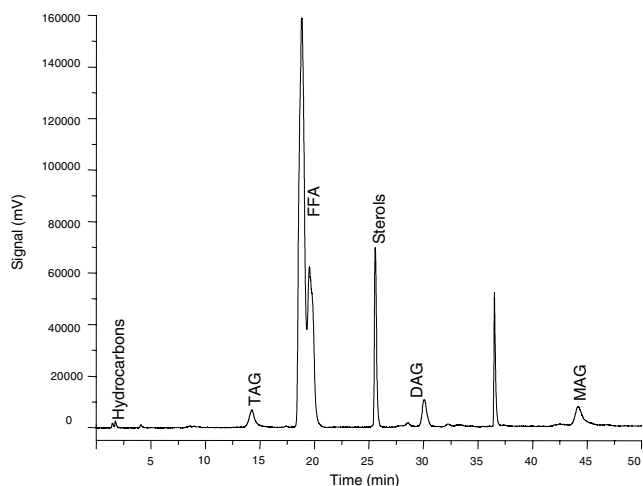


Fig. 1 HPLC-ELSD chromatogram of the supercritical CO₂ extract obtained at 200 atm and 80 °C (extract 3). See Experimental section for rest of the conditions

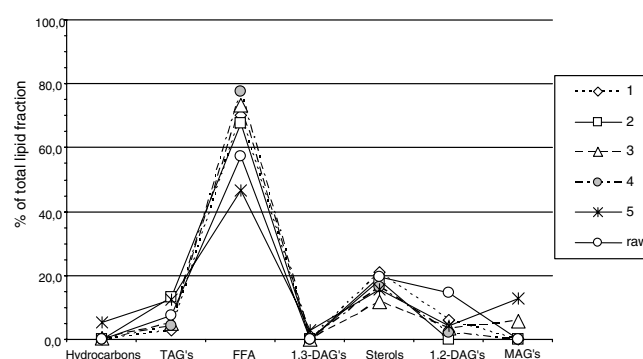


Fig. 2 Lipid class composition of the five supercritical fluid extracts of Table 1 and a raw *Chaetoceros muelleri* extract using liquid–liquid extraction. (TAG: tryglicerides; FFA: free fatty acids; 1,3-DAGs: 1,3-diacylglycerides; 1,2-DAGs: 1,2-diacylglycerides; MAGs: monoglycerides)

using classical liquid–liquid extraction is shown in Fig. 2. As can be observed, free fatty acids (FFA) were, in general, the main components accounting, in some extracts, for more than 75% of the total lipids. In general terms, free fatty acids were the most abundant family after sterols followed by DAGs, TAGs and MAGs. Analysis of sterol fraction allowed identifying cholesterol as the main product; the presence of cholesterol had been previously suggested by other authors in *Chaetoceros* [2, 18]. As can be seen in Fig. 2, the relative contribution of the different families to the total lipid fraction mainly depends on the extraction conditions, corroborating the specificity that the use of supercritical CO₂ as extractant provides (e.g., compare in Fig. 2 extracts 4 and 5 in terms of MAG, FFA and TAG contents).

A detailed FFA content was performed by using GC-FID analysis. This was required on the basis of the fact that antimicrobial activity has already been linked to fatty acids content [19, 20]. Figure 3 shows the GC chromatogram of the extract 3 (obtained with CO₂ at 200 atm and 80 °C), the one that has provided the best antimicrobial activity. The chromatogram is divided in zones including the fatty acids with the same carbon chain length. As can be seen, C16 fatty acids (C16:0, C16:2, C16:3) are the most abundant family of fatty acids in this extract, being also remarkable the presence of long chain polyunsaturated fatty acids (EPA, DPA and DHA) whose antimicrobial activity has already been suggested [3]. Figure 4 shows the distribution of the different fatty acids detected in the five supercritical extracts compared to the raw extract. As can be seen, big differences can be found among the extracts which also could be associated to the extraction conditions used, corroborating the specificity of the extraction procedure used in this work.

Cluster analysis has been employed to establish some correlation between antimicrobial activity and the lipid composition of the extracts, including TAG, DAG, MAG, FFA, sterols, hydrocarbons content and the relative composition of fatty acids (as mol%). Figure 5 shows the dendrogram of standardized variable data obtained using the Pearson's correlation coefficient (absolute value) as

Fig. 3 GC-FID chromatogram of the supercritical CO₂ extract obtained at 200 atm and 80 °C (extract 3). *Squares* delimit the zones with the same length in fatty acid carbon chain. See Experimental section for rest of the conditions

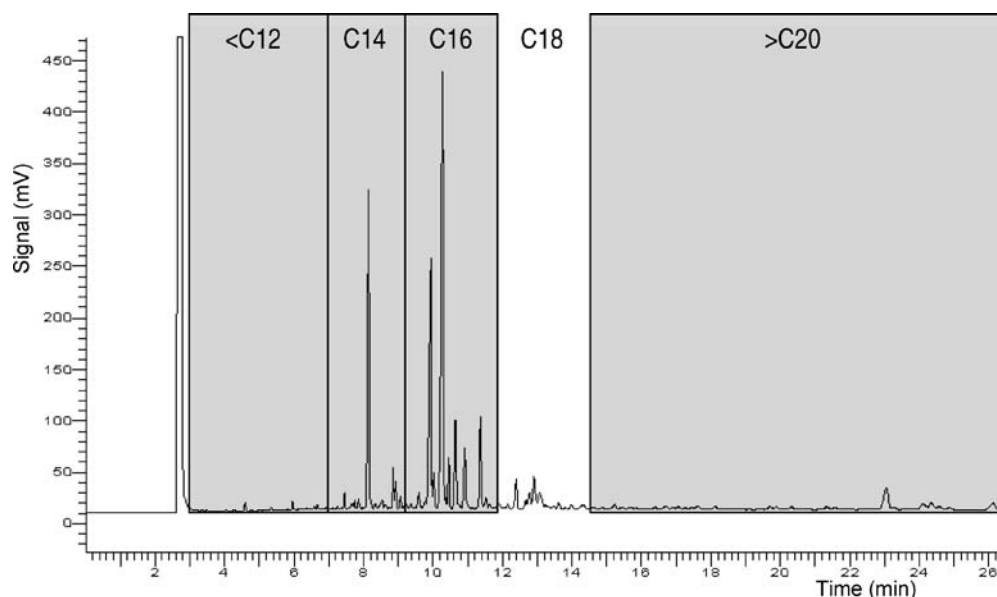
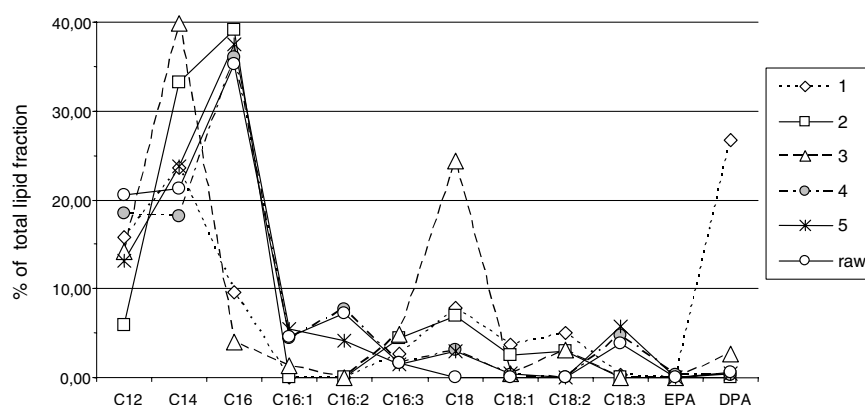


Fig. 4 Fatty acid composition of the five supercritical fluid extracts of Table 1 and a raw *Chaetoceros muelleri* extract using liquid-liquid extraction

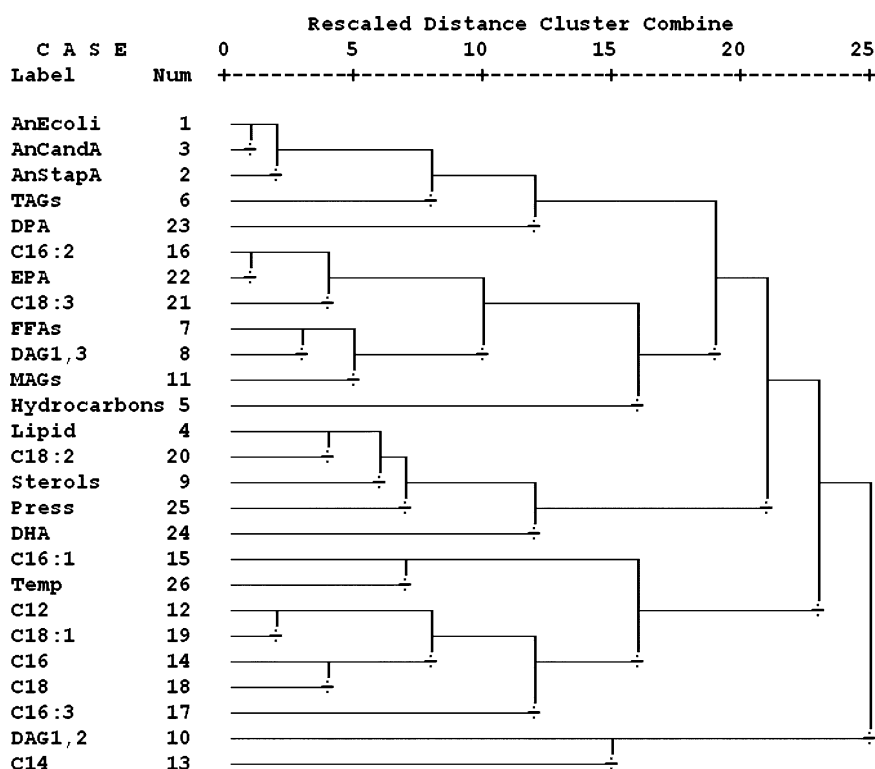


measure of similarity among two variables and the average linkage as linkage rule between groups. In this dendrogram, a significant relationship can be observed between the antimicrobial activities against all the microorganisms tested and the triglycerides (TAGs) and DPA content. There exists a negative correlation between the antimicrobial activity and the TAGs (with Pearson correlation coefficients ranging from -0.745 to -0.796) and a positive correlation with DPA (Pearson correlation coefficient for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* equal to 0.839), meaning that an increase of DPA implies an increase in the value of Minimal Bactericidal Concentration (MBC) and, therefore, a decrease in the effective antimicrobial activity. The opposite is observed with TAGs, meaning that an increase in its relative contribution to the composition of the sample implies a higher antimicrobial activity (or lower MBC concentration). Although the other variables grouped together in the cluster, no relationship can be observed with the antimicrobial activity. Even though FFA have been strongly associated to the antimicrobial activity of different extracts [4, 21, 22], in this particular case, no correlation was observed either individually or as a

sum of fatty acids. Moreover, the total content on fatty acids of recognized antimicrobial activity (such as C16:1, C18:2 and C18:3) [3, 23] did not give any correlation with the observed antimicrobial activities suggesting a more complex behavior, a strong contribution of other lipids and/or an inhibition of the fatty acids antimicrobial effects due to the cholesterol concentration in the extracts [5].

Principal component analysis was also applied to establish relationships among antimicrobial activity and lipid composition. Five principal components were obtained that explained 97.6% of the total variance of data. Rotation of the five principal components (through Varimax method) provided the following results: the first principal component, which explained 30% of the total variance, was negatively correlated with C18 (-0.95), C18:1 (-0.95), C16 (-0.91) and C12 (-0.85) while the second component (which explained 25.2% of the variance) was strongly correlated positively with the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (0.978), *Escherichia coli* (0.939), *Candida albicans* (0.939) and DPA (0.822) and negatively correlated with TAGs (-0.821) what really confirms the results obtained by cluster analysis.

Fig. 5 Dendrogram of the 26 variables using the average linkage rule



Conclusions

The present study has demonstrated the interest of using supercritical CO₂ to obtain extracts of *Chaetoceros muelleri* with antimicrobial activity. The strong influence of the supercritical extraction conditions in both, the lipid composition of the extracts and, consequently, in the antimicrobial activity has also been shown. Statistical analysis of all the data, considering lipid composition and relative concentration of fatty acids in the different extracts suggested an important relationship among antimicrobial activity and triglyceride content (TAG) and DPA. This study is presented as a first step to optimize the green extraction of antimicrobials from *Chaetoceros muelleri* that could be used as food preservatives.

Acknowledgements This work has been financed by Spanish Ministry of Education (Project AGL2005-06726-C04-01 and 02) and by CSIC/CONACYT (2004MX0008). JAM and AT would like to thank Spanish Ministry of Education their grants.

References

- Chiou SY, Su WW, Su YC (2001) J Biotechnol 85:247–257
- Pernet F, Tremblay R, Demers E, Roussy M (2003) Aquaculture 221:393–406
- Benkendorff K, Davis AR, Rogers CN, Bremner JB (2005) J. Exp Mar Biol Ecol 316:29–44
- Kabara JJ, Vrable R, Lie Ken Jie MSF (1977) Lipids 12:753–759
- Galbraith H, Miller TB, Paton AM, Thompson JK (1971) J Appl Bacteriol 34:803–813
- Birtigh A, Johannsen M, Brunner G, Nair N (1995) J Supercrit Fluids 8:46–50
- Hurtado-Benavides AM, Senorans FJ, Ibanez E, Reglero G (2004) J Supercrit Fluid 28:29–35
- Rodrigues CEC, Reipert ECD, de Souza AF, Filho PAP, Meirelles AJA (2005) Fluid Phase Equilib 238:193–203
- Guillard RR, Ryther JH (1962) Can J Microbiol 8:229–239
- Brunner G (2005) J Food Eng 67:21–33
- Torres CF, Vazquez L, Senorans FJ, Reglero G (2005) J Chromatogr A 1078:28–34
- NCCLS (1999) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M100-S9, vol 19. Wayne, PA
- Sze P (1986) A Biology of the Algae, vol 1. WCB/McGraw-Hill Publishers, London, UK
- Andrich G, Zinnai A, Nesti U, Venturi F, Fiorentini R (2005) Proceedings of ICheaP-7 (The Seventh Italian Conference on Chemical & Process Engineering), Taormina, Italy, Chemical Engineering Transactions
- Lim GB, Lee SY, Lee EK, Haam SJ, Kim WS (2002) Biochem Eng J 11:181–187
- Herrero M, Cifuentes A, Ibanez E (2006) Food Chem 98:136–148
- Leistner L (2000) Int J Food Microbiol 55:181–186
- Parrish CC, Wells JS, Yang Z, Dabinett P (1999) Mar Biol 133:461–471
- Borowitzka MA (1999) In: Cohen Z (ed) Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae in “Chemicals from microalgae”. Taylor & Francis, London, UK, pp 313–352
- Skrivanova E, Marounek M, Dlouha G, Kanka J (2005) Lett Appl Microbiol 41:77–81
- Vairappan CS (2003) Indian J Exp Biol 41:837–845
- Yajima M, Nozaki K, Takayanagi T, Yokotsuka K (1997) J Antibact Antifung Agent 25:131–137
- Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Begin A (1997) Int J Food Microbiol 37:155–162

Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*

J.A. Mendiola^a, L. Jaime^{a,*}, S. Santoyo^a, G. Reglero^a, A. Cifuentes^b,
E. Ibañez^b, F.J. Señoráns^a

^a Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación, Facultad de Ciencias, Módulo C-XVI, 505, Universidad Autónoma de Madrid, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^b Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

Received 13 June 2005; received in revised form 7 June 2006; accepted 7 June 2006

Abstract

Supercritical fluid extraction and fractionation of *Spirulina platensis* were carried out in order to obtain functional extracts with antioxidant and/or antimicrobial activities. The β -carotene bleaching method and DPPH[•] free radical-scavenging assay were used to determine the optimal extraction conditions for antioxidant compounds. The best antioxidant extract was obtained in the first fraction when using intermediate pressures and temperatures (220–320 bar, 55 °C), with CO₂ plus 10% ethanol as cosolvent, whereas higher pressures and temperatures (320 bar, 75 °C) were needed when pure CO₂ was used. Besides, antimicrobial activities of microalgae extracts were tested against four different microbial species, including a gram positive bacterium (*Staphylococcus aureus*), a gram negative bacterium (*Escherichia coli*), a yeast (*Candida albicans*) and a fungus (*Aspergillus niger*). The most active fraction against all the microorganisms tested, was the one collected in the second fraction in the experiment performed at 220 bar and 26.7 °C with 10% of ethanol.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Spirulina platensis*; Supercritical fluid extraction; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; DPPH; β -Carotene bleaching

1. Introduction

Spirulina platensis, a blue green microalga, has been used since ancient times as a source of food because of its high protein and nutritional value (Dillon, Phuc, & Dubacq, 1995). Recently, this alga is being widely studied, not only for nutritional reasons but also for its reported medicinal properties; thus, several studies have shown that *Spirulina* or its extracts could prevent or inhibit cancer in humans and animals and recent works have indicated that this specie has immuno-promoting effects (Hirahashi et al., 2002; Subhashini et al., 2004). *S. platensis* was also reported to present antimicrobial activity (Demule, Decaire, & Decano, 1996; Ozdemir, Karabay, Dalay, & Pazar-

basi, 2004) as well as to inhibit replication of several viruses, such as Herpes simplex and HIV-1 (Ayehunie, Belay, Baba, & Ruprecht, 1998; Hernández-Corona, Nieves, Meckes, Chamorro, & Barron, 2002). Moreover, *Spirulina* contains a whole spectrum of natural mixed carotene and xanthophyll phytopigments which, together with phycocyanin, seem to be related to its antioxidant activity (Bhat & Madyastha, 2000; Miranda, Cintra, Barros, & Manchini, 1998; Piñeiro Estrada, Bermejo Bescós, & Villar del Fresno, 2001).

In recent years, supercritical fluid extraction has received increasing attention as an important alternative to the traditional solvent extraction methods, since this technique provides a high speed and efficiency of extraction, eliminates concentration steps and avoids the use of organic solvents which are potentially harmful in terms of environmental impact. Supercritical fluid extraction

* Corresponding author. Tel.: +34 914973777; fax: +34 914973778.
E-mail address: laura.jaime@uam.es (L. Jaime).

(SFE) is an extraction/fractionation method that exploits the unique properties of gases above their critical points to extract soluble components from a raw material. Carbon dioxide is an ideal solvent for the extraction of some classes of natural substances for food uses because is non-toxic, non-explosive, readily available and easy to remove from extracted products. Consequently, the quality of supercritical fluid extracts is higher than those obtained by liquid-liquid extraction with organic solvents or by steam distillation, since these methods can either induce thermal degradation or leave toxic residual solvent in the products.

Supercritical CO₂ extraction has been used by some authors to separate and purify active components from *Spirulina*, such as carotenoids and γ -linolenic acid, and these extracts have been compared with those obtained by solvent extraction (Careri et al., 2001; Mendes, Nobre, Cardoso, Pereira, & Palavra, 2003). Data provided by these authors demonstrate the advantages of SFE for extraction of compounds with pharmaceutical importance from these algae, since the developed process was easier and faster than was solvent extraction and thus more effective and convenient.

This research describes the results of primary screening for antioxidant and antimicrobial activities of SFE extracts of *Spirulina platensis* obtained using CO₂ and CO₂ plus ethanol as cosolvent under different conditions. The study was directed toward the optimization of the extraction and fractionation conditions to obtain extracts with antioxidant and/or antimicrobial activities.

2. Materials and methods

2.1. Samples and chemicals

Microalgae samples (*S. platensis*) consisted of air-dried microalgae with 6% moisture mass, from Algamar (Pontvedra, Spain), stored under dry and dark conditions.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH[•], 95% purity) was obtained from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Linoleic acid and β -carotene were purchased from Fluka (Madrid, Spain). CO₂ (N-38 quality) was obtained from Air Liquide España S.A. (Madrid, Spain).

2.2. Extraction method

All extractions were carried out in a pilot-scale plant for supercritical fluid extraction (Iberfluid, Spain) with a 285 ml extraction cell, previously described (Señorans, Ibáñez, Cavelero, Tabera, & Reglero, 2000). The extraction cell was made of 316 steel and was equipped with a 0.5 μ m frit at the inlet and a 2 μ m frit at the outlet. The extraction pressure was controlled by micrometering valves, and the carbon dioxide pump was from Dosapro (France). Fractionation was achieved in two different separators, with independent control of temperature and pressure, by a decrease in pressure.

For each experiment, the extraction cell was filled with 75 g of microalgae and 120 g of washed sea sand (Panreac, Spain). Dynamic extractions were performed under the experimental conditions shown in Table 1. The extraction

Table 1
Conditions used for the experiments performed on a pilot plant scale

Exp.	EtOH ^a (%)	P_{ext} ^b (bar)	T_{ext} ^c (°C)	ρ_{ext} ^d (g/ml)	P_{s1} ^e (bar)	ρ_{s1} ^f (g/ml)	P_{s2} ^g (bar)
1	10	78	55	0.195	39	0.074	19.5
2	10	120	35	0.768	60	0.159	30
3	10	120	75	0.318	60	0.113	30
4	10	220	27	0.920	110	0.820	55
5, 6	10	220	55	0.781	110	0.416	55
7	10	220	83	0.618	110	0.248	55
8	10	320	35	0.940	160	0.828	55
9	10	320	75	0.785	160	0.507	55
10	10	361	55	0.888	180.5	0.724	55
11	0	78	55	0.195	39	0.074	19.5
12	0	120	35	0.768	60	0.159	30
13	0	120	75	0.318	60	0.113	30
14	0	220	27	0.920	110	0.820	55
15, 16	0	220	55	0.781	110	0.416	55
17	0	220	83	0.618	110	0.248	55
18	0	320	35	0.940	160	0.828	55
19	0	320	75	0.785	160	0.507	55
20	0	361	55	0.888	180.5	0.724	55

^a % Ethanol added as modifier.

^b Extraction pressure.

^c Extraction temperature.

^d Extractor density.

^e Pressure in separator 1.

^f Density in separator 1.

^g Pressure in separator 2.

pressure ranged from 78 to 361 bar, and fractionation pressures were set in a first stage at 50% of extraction pressure and, in the second stage, were set, at 50% of the first stage, respecting a maximum of 55 bar. Extraction temperatures ranged from 27 to 83 °C and were kept constant in both separators at the corresponding extraction temperature. Extraction time was 75 min in all experiments.

As for the extractions using ethanol as modifier, the addition started after having reached the selected pressure during 75% of the extraction time. Ethanol was added in an amount corresponding to 10% of CO₂ (v/v). All extracts were kept under N₂, at –20 °C in the dark, and ethanol, when present as modifier, was eliminated at 35 °C in a vacuum rotary evaporator.

2.3. β -Carotene bleaching method

The procedure is based on a previously reported method with slight modifications (Veliloglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998). 0.2 ml of *Spirulina* extracts (25 µg/ml and 50 µg/ml of ethanolic extracts in the liposome solution) or 0.2 ml of pure ethanol (as control) was added to a reagent mixture, containing 0.2 ml of β -carotene solution (1 mg/ml in chloroform), 20 mg of linoleic acid, and 200 mg of Tween 20 and the final mixture was evaporated to dryness under a nitrogen stream. Distilled water (50 ml) was added and the mixture was vigorously shaken to form a liposome solution. The samples were then subjected to thermal autoxidation at 50 °C for 3 h. The absorbance of these solutions was measured at 470 nm using a Shimadzu UV-120-01 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Due to the coloration of the extracts, blank extracts were prepared, where 0.2 ml of chloroform was added instead of 0.2 ml of β -carotene solution. All samples were assayed in duplicate. Butylated-hydroxy-toluene (BHT) and ascorbic acid (Sigma) (1 µg/ml) were used as standards. The antioxidant activity (AA) was calculated in terms of percent inhibition relative to the control using the following equation:

$$AA (\%) = [(R_{\text{control}} - R_{\text{sample}})/R_{\text{control}}] \times 100$$

where $R = \ln[\text{Abs}(t_0)/\text{Abs}(t_{180})]/180$.

2.4. DPPH[•] free radical-scavenging assay

The method, based on a procedure described by Brand-Willians, Cuvelier, and Berset (1995), consisted of the neutralization of DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radicals by the antioxidant extracts. For each antioxidant extract, six different concentrations were tested (from 20 µg/ml to 350 µg/ml in the reaction mixtures). 3.9 ml of DPPH[•] solution (6×10^{-5} mol/l in methanol) were placed in test tubes and 0.1 ml of the different concentrations of *Spirulina* extracts were added. Absorbance was measured at 516 nm in a Shimadzu UV-120-01 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) until the reaction reached a steady state. Methanol was used to adjust zero, DPPH[•]-methanol solution as a reference sample and ascorbic acid

and BHT as standards. The radical scavenging activities of SF extracts in the reaction medium were calculated from a calibration curve at 516 nm. The percentage of remaining DPPH against the extract concentration was then plotted to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or EC₅₀. Each determination was repeated twice.

2.5. TLC

Analytical-TLC was carried out in TLC plates (10 cm × 20 cm) cut from the commercially available sheets according to the Jaime et al. (2005) procedure. Twelve microliters of 30 mg/ml extract solution was applied to 1 cm of the base of the silica gel layer and allowed to dry for a few minutes. Afterwards, the plate was eluted in a closed chamber with mobile phase (petroleum ether:acetone (75:25)). Afterwards, the developed silica layers were stained with a 0.5 mM DPPH[•] radical, as described in the Jaime et al. (2005) procedure.

2.6. Microbial strains

The SFE extracts were individually tested against a panel of microorganisms, including *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Candida albicans* ATCC 60193 and *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Bacterial strain stock cultures were kept on nutrient agar at 4 °C. *C. albicans* was kept on Sabouraud dextrose agar at 4 °C. *A. niger* spores were obtained in vitro from monoconidial cultures after incubation (7 days, 24 °C) on potato dextrose agar, harvested in sterile distilled water containing 0.1% Tween 80 and stored at 4 °C until used as inocula.

2.7. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal and fungicidal concentration (MBC)

A broth microdilution method was used, as recommended by NCCLS, for determination of the minimum inhibitory concentration (NCCLS, 1999). All tests were performed in Mueller–Hinton broth supplemented with 0.5% Tween 20, with the exception of yeasts and fungi (Sabouraud dextrose broth + 0.5% Tween 20). The inocula of bacterial strains were prepared from overnight Mueller–Hinton broth cultures at 37 °C. Yeasts and fungi were cultured overnight at 25 °C in Sabouraud dextrose broth. Test strains were suspended in Mueller–Hinton (bacteria) or Sabouraud dextrose (yeast and fungi) broth to give a final density 10⁷ cfu/ml. The *S. platensis* extract dilutions in DMSO ranged from 250 to 10 mg/ml.

The 96-microwell plates were prepared by dispensing, into each well, 165 µl of culture broth, 5 µl of the inocula and 30 µl of the different extract dilutions. The final volume of each well was 200 µl. Plates were incubated at 37 °C for 24 h for bacteria and at 24 °C for 48 h for yeast and fungus.

Negative controls were prepared, using 30 μ l of DMSO, the solvent used to dissolve the microalgae extracts. Chloranphenicol and amphotericin B (Sigma, Madrid) were used as positive reference standards to determine the sensitivity of the microbial species used. After incubation, the MIC of each extract was determined by visual inspection of the well bottoms, since bacterial growth was indicated by the presence of a white “pellet” on the well bottom. The lowest concentration of the extract that inhibited growth of the microorganism, as detected as lack of the white “pellet”, was designated the minimum inhibitory concentration. The minimum bactericidal and fungicidal concentration was determined by making subcultures from the clear wells which did not show any growth. Each test was performed in triplicate and repeated twice.

2.8. Lipid composition analysis

Gas chromatography, coupled to a flame ionization detector (GC-FID), was used to identify the free and esterified fatty acids of *S. platensis* extracts.

To prepare ethyl esters of free and esterified fatty acids, samples were mixed with chloroform/ethanol 2/1 (v/v) and ethylated by addition of 1 ml of a solution of sulfuric acid in ethanol (0.9 M). This mixture was allowed to stand overnight at 50 °C. After addition of 200 μ l milliQ water, the resulting mixture was extracted with two 1 ml portions of *n*-hexane and the final extract was then dried with sodium sulfate.

One microlitre of derivatized sample was injected into a Perkin–Elmer autosystem XL (Wellesley, MA, USA) gas chromatograph with a 30 m BTR-Carbowax column (0.25 mm i.d.). Injector and detector temperatures were set at 220 and 230 °C, respectively. The temperature programme was as follows: starting at 100 °C and then heating to 180 °C at 20 °C/min followed by heating from 180 to 220 °C at 15 °C/min. The final temperature (220 °C) was held for 30 min. Identification of the ethyl esters of the various fatty acids was based on a menhaden oil fish standard (#4-7085) obtained from Supelco (Bellefonte, PA).

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using the statistical package StatGraphics version 5 (Manugistics Software).

3. Results and discussion

3.1. General

Since various parameters potentially affect the SFE process, the optimisation of the experimental conditions represents a critical step in the development of a SFE method. In fact, solubility of the different compounds can be controlled by the composition and density of the extraction

fluid and thus depend on the extraction pressure and temperature used. In this study, a screening of different SFE conditions considering two factors (extraction pressure and temperature) was performed in order to optimize the extraction of antioxidants and/or antimicrobials from *S. platensis*. Experiments were chosen to cover a wide range of conditions, as shown in Table 1, always considering the experimental limitations of the pilot scale plant used in this study and previous data appearing in the literature for the extraction of valuable compounds from microalgae (Careri et al., 2001; Cocero, González, Perez, & Alonso, 2000; Mendes et al., 2003; Robles Medina, Molina Grima, Giménez Giménez, & Ibañez Gonzalez, 1998; Subra, Castellani, Jestin, & Aoufi, 1998). As mentioned, extraction pressures ranged from 78 to 361 and extraction temperatures between 27 and 83 °C, which implies using densities from 0.195 to 0.94 g/ml. The complete set of experiments was done in duplicate, using pure CO₂ and CO₂ plus 10% ethanol as modifier. Using modifiers allows increasing of the polarity of the extracting agent while changing the viscosity of the fluid. Sometimes a two-phase system is obtained (as in the present work when using 78 bar and 55 °C) which allows liquid and supercritical extraction simultaneously. Furthermore, a fractionation of microalgae extracts in two separation vessels by means of cascade depressurisation was carried out, allowing the recovery of two different extracts with different compositions and chemical characteristics.

Extraction time was fixed previously through sequential extractions of the same sample under selected conditions (220 bar and 55 °C without modifier). The extraction time was set at the beginning of the asymptotic curve yield (%)–time (min). Fig. 1 shows the evolution of the yield vs extraction time under the extraction conditions tested.

Dark green and dark maroon extracts were collected in fraction 1 with and without ethanol as modifier, respectively; meanwhile maroon-reddish and orange colours were found in fraction 2 extracts.

3.2. Antioxidant activity

Two different methods were used to find the optimal extraction conditions of antioxidant compounds. The β -carotene bleaching method was used as a reference of lipid peroxidation of unsaturated fatty acids that has been known to cause many pathological effects. On the other hand, DPPH \cdot is a purple stable radical that turns yellowish when it reacts with antioxidant analytes, and the degree of discoloration indicates the scavenging potential of the antioxidant extract.

The antioxidant activities of the extracts are shown in Tables 2 and 3 for the β -carotene bleaching and DPPH \cdot methods, respectively. Results indicated that supercritical fluid extracts obtained under different extraction conditions exhibited various degrees of antioxidant activity in both the DPPH \cdot the free radical-scavenging and β -carotene bleaching methods.

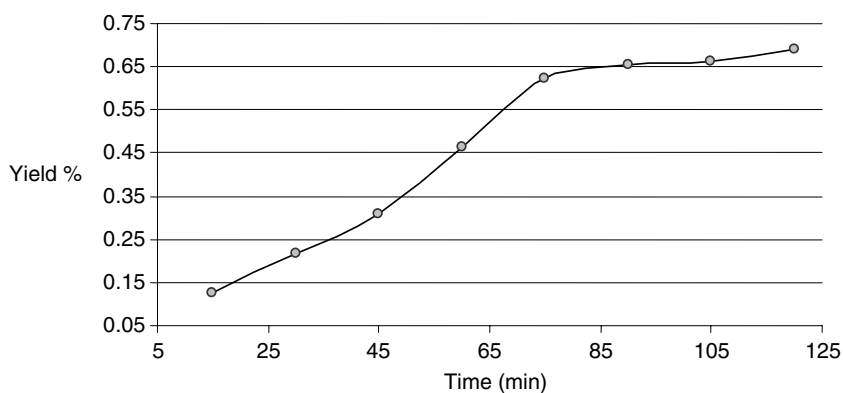


Fig. 1. Evolution of yield (%) vs extraction time. Extraction conditions: 220 bar, 55 °C, neat CO₂ as extracting solvent.

Table 2

Antioxidant activity of *S. platensis* SF extracts at different concentrations and BHT (1 µg/ml in the reaction mixture) in the bleaching β-carotene method (%)

Exp.	Separator 1		Separator 2	
	25 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
1	54 ± 1	84 ± 1	30 ± 2	61 ± 1
2	55 ± 3	68 ± 1	8 ± 1	36 ± 4
3	52 ± 2	77 ± 1	21 ± 2	38 ± 2
4	70 ± 0	84 ± 0	1 ± 0	16 ± 1
5	90 ± 0	95 ± 1	47 ± 1	78 ± 3
6	93 ± 0	94 ± 0	60 ± 1	84 ± 1
7	80 ± 0	89 ± 1	29 ± 2	62 ± 2
8	91 ± 0	93 ± 0	43 ± 4	74 ± 0
9	87 ± 2	94 ± 0	32 ± 0	52 ± 2
10	77 ± 2	87 ± 2	13 ± 3	48 ± 2
11	60 ± 1	84 ± 0	21 ± 2	57 ± 3
12	17 ± 1	65 ± 6	28 ± 4	47 ± 7
13	27 ± 4	53 ± 1	24 ± 2	48 ± 3
14	31 ± 4	55 ± 5	4 ± 0	20 ± 3
15	41 ± 4	68 ± 1	21 ± 2	63 ± 1
16	38 ± 4	72 ± 1	23 ± 3	65 ± 1
17	57 ± 0	85 ± 0	19 ± 4	38 ± 2
18	35 ± 1	76 ± 0	16 ± 1	26 ± 2
19	91 ± 2	95 ± 0	62 ± 7	89 ± 0
20	50 ± 2	83 ± 1	72 ± 1	90 ± 0
Ascorbic acid	54 ± 1			
BHT	81 ± 2			

In relation to fractionation of *S. platensis* extracts from different supercritical extraction conditions (Table 2), in general, antioxidant activity was higher in the fraction 1 than in the fraction corresponding to separator 2. Moreover, the most active extracts in separator 1 also showed the highest antioxidant activities in fraction 2. The main difference between fractions 1 and 2 was the pressure in the vessel. This different pressure brought about a gradual precipitation of the extracts compounds on the basis of their solubility in the extracting solvent under the experimental conditions.

An analytical-TLC of the best antioxidant SF extracts was carried out to investigate inquire into the types of compounds responsible for that antioxidant activity (Figs. 2 and 3). Orange, yellow, orange-yellowish and green bands

were found in the TLC plates eluted with petroleum ether:acetone (75:25), in agreement with the colours of the main pigments described in *S. platensis* (Becker & Venkataraman, 1984; Gireesh et al., 2001): chlorophyll a and different carotenoids, such as β-carotene, β-cryptoxanthin, zeaxanthin, echinenone, oscillaxanthin and myxoxanthophyll. Moreover, β-carotene and lutein standards showed $R_f = 0.99$ and 0.18, respectively (Fig. 2). These results are in agreement with several authors who have reported R_f values of different carotenoid compounds, using similar eluents (Van den Hoek, Mann, & Jahns, 1995; Gireesh et al., 2001). In these studies, β- and α-carotene bands were always found at the top of the TLC, and lutein/zeaxanthin (that elute at the same R_f) showed R_f values close to 0.2, whereas cryptoxanthin, asthaxanthin and

Table 3
DPPH[•] radical scavenging activity of *S. platensis* SF and ascorbic acid expressed as EC50 (μg/ml).

Exp.	Separator 1	Separator 2
	EC50 (μg/ml)	EC50 (μg/ml)
1	111.8 ± 5.6	204.5 ± 3.6
2	129.4 ± 3.8	166.8 ± 9.2
3	93.9 ± 3.6	107.0 ± 5.6
4	176.0 ± 15.8	112.4 ± 3.1
5	71.6 ± 2.5	73.9 ± 5.7
6	66.7 ± 8.4	63.1 ± 0.2
7	96.5 ± 2.1	122.5 ± 8.5
8	255.5 ± 9.6	64.5 ± 1.1
9	83.1 ± 1.4	287.5 ± 5.5
10	167.5 ± 8.3	131.9 ± 4.7
11	337.2 ± 89.0	297.8 ± 2.7
12	48.8 ± 7.7	239.9 ± 17.2
13	205.10 ± 24.85	171.1 ± 21.3
14	85.3 ± 2.5	213.9 ± 55.8
15	133.5 ± 6.0	186.3 ± 1.5
16	135.0 ± 9.3	187.4 ± 18.1
17	105.6 ± 7.5	139.7 ± 13.8
18	102.0 ± 2.8	207.7 ± 38.5
19	20.0 ± 1.7	129.4 ± 3.9
20	94.7 ± 7.5	92.5 ± 3.8
Ascorbic acid	4.4 ± 0.2	
BHT	18.1 ± 0.6	

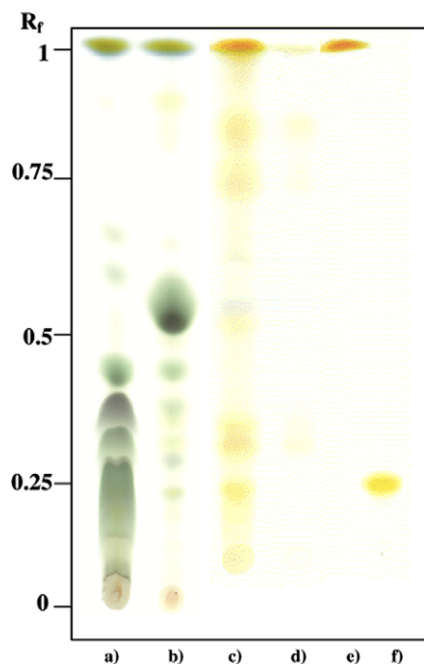


Fig. 2. Analytical-TLC of *S. platensis* SF extracts: (a) Exp. 5; S1, (b) Exp. 5; S2, (c) Exp. 19; S1, (d) Exp. 19 sep. 2, (e) β-carotene standard and (f) lutein standard.

other xanthophylls presented variable intermediate R_f values, depending on their esterification. Thus, as zeaxanthin, instead of lutein, has been described in *S. platensis*, β-carotene and zeaxanthin are probably the main pigments

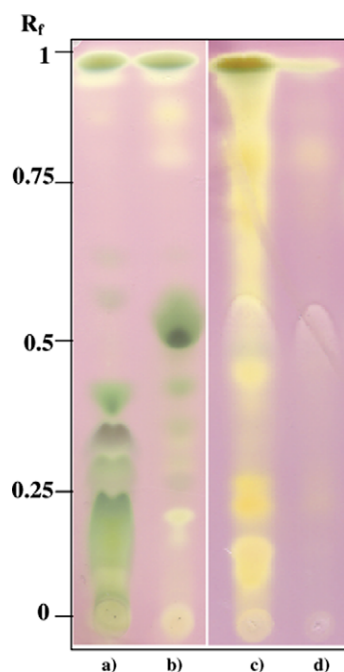


Fig. 3. Analytical-TLC of *S. platensis* SF extracts stained with 0.5 M DPPH[•] solution: (a) Exp. 5; S1, (b) Exp. 5; S2, (c) Exp. 19; S1 and (d) Exp. 19; S2.

found in SF extracts, together with other minor carotenoids. Furthermore, green wide bands were found in SF extracts with CO₂ as cosolvent, mainly in separator 1. Moreover, some of these green and grey-greenish bands might correspond to pheophytin-like compounds that come from the partial degradation of chlorophyll a (Quach, Steeper, & Griffin, 2004).

In a previous work done in our laboratory, an exhaustive characterization of supercritical fluid extracts of *S. platensis* by LC–MS was performed (Mendiola et al., 2005). β-Carotene, zeaxanthin, myxoxanthophyll and chlorophyll a were identified as the main constituents of the extracts. Other pigments, such as, pheophytin-like compounds, and siphonein and astaxanthin, together with other minor carotenoids were also found.

Developed TLC plate was stained with 0.5 M DPPH[•] solution to determine the compounds responsible for the antioxidant activity of the extracts. Using this procedure, compounds with antioxidant activity turned out to be brilliant yellow in the purple background of the plate. The intensity of the yellow colour depends on the amount and nature of radical scavengers present in the extract. Orange and orange-yellowish bands showed a high antioxidant capacity (Fig. 3). Therefore, carotenoids seemed to be the main antioxidant components of SF extracts.

The extract with CO₂ plus 10% ethanol as modifier not only gave a higher yield of the extract (1.9% on average compared to 0.23% when neat CO₂ was used) but also turned out to possess higher antioxidant activity than did the extracts with pure supercritical CO₂. This behaviour was confirmed by the two antioxidant methods and is in

agreement with data reported in the literature for supercritical fluid extraction of carotenoids from *S. platensis* (Careri et al., 2001). As reported by Marsili and Callahan (1993), an essential drawback in the use of supercritical CO₂ is its low polarity and the insufficient interaction between supercritical CO₂ and the matrix. Nevertheless, this limitation may be overcome by adding to the supercritical CO₂ small amounts of polar modifiers, such as ethanol in order to increase its solvating power, thus improving the extraction efficiency. In this way, ethanol has been described as the most effective modifier in the extraction of carotenoids from vegetables.

Since analytes with different polarity show a better recovery in those extractions using ethanol as cosolvent, the effect of the modifier results may be related, not only to the change in polarity of the extraction fluid, but also to its interaction with the matrix (Hawthorne, Krieger, & Miller, 1988). Thus, extracts obtained with CO₂ and 10% ethanol as modifier presented lower amounts of β -carotene but higher quantities of more polar xanthophylls. It is important to underline that several authors have reported that not only α - and β -carotene but other carotenoids such as lycopene, zeaxanthin, lutein, echinenone, astaxanthin and canthaxanthin, well described in blue-green algae, show antioxidant activity against radicals, together with synergies between them, that probably contribute to the antioxidant activity of each fraction (Bohm, Puspitasari-Nienaber, Ferruzzi, & Schwartz, 2002; Van den Hoek et al., 1995).

In order to understand the behaviour of the SF extracts, antioxidant activity as affected by of extraction conditions (pressure, temperature and modifier), the response surfaces of antioxidant values with a concentration of 50 μ g/ml of fraction 1 in the reaction mixture were plotted. Since both antioxidant methods showed similar estimated response surfaces, only those corresponding to the antioxidant activities obtained using the β -carotene bleaching method are shown (Fig. 4). As can be inferred from the three-dimensional plots, pressure of the supercritical fluid plays an important role in the SFE of antioxidant compounds from *S. platensis*.

Different estimated response surfaces were achieved with and without ethanol as modifier (Fig. 4a and b, respectively). With regard to antioxidant activities obtained using pure CO₂ (Fig. 4a), antioxidant activity of the extracts enhanced as pressure increased, especially at high temperatures. Opposite to this, rise in temperature at low pressure caused a loss of antioxidant capacity, whereas at high pressure antioxidant value increased with increasing temperature. Mendes et al. (1995) obtained similar results in carotenoid extraction with supercritical CO₂ from *Chlorella vulgaris*. The optimum extraction conditions would be 360 bar and 74 °C with pure CO₂.

On the other hand, a different response surface was achieved when using ethanol as modifier. Fig. 4b shows that antioxidant capacity was enhanced as extraction pressure increased up to 275 bar; moreover, better results were

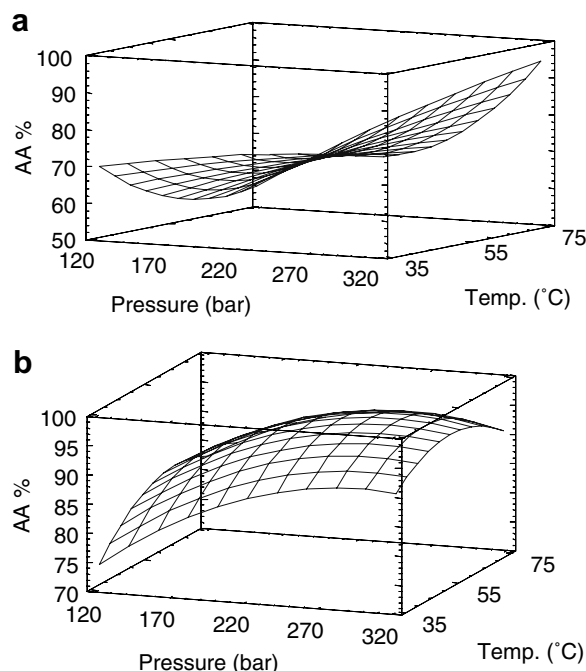


Fig. 4. Response surfaces for antioxidant activity (AA) of *Spirulina* SFE extracts (a) with pure CO₂ and (b) with CO₂ + 10% ethanol as modifier.

achieved at intermediate temperature whether the extraction pressure increased or not. The best extraction conditions would be obtained at 275 bar and 57 °C.

As Fig. 4a and b show, antioxidant activity of extracts was enhanced as the pressure increased. The increase in the extraction pressure caused an increase of the fluid density and thus it could have a double effect: an increase of the solvating power of the supercritical fluid, responsible for quantitative recoveries, and a higher interaction between the fluid and the matrix (Careri et al., 2001).

3.3. Antimicrobial activity of the SFE extracts

Four different microbial species, including a gram negative bacterium (*E. coli*), a gram positive bacterium (*S. aureus*), a yeast (*C. albicans*) and a fungus (*A. niger*), were used to screen the possible antimicrobial activity of *S. platensis* supercritical fluid extracts. In the extractions obtained with ethanol as modifier, the antimicrobial experiments were carried out with the fractions recovered in the first (S1) and in the second (S2) separators. On the other hand, in the extractions performed with pure CO₂, the antimicrobial activity was tested only in the fractions from the second separator, since the yield of the fraction recovered in the first one was not enough for the antimicrobial assays. The antimicrobial activity was quantitatively assessed by the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal and fungicidal concentration (MBC).

Results obtained (Table 4) showed that *C. albicans* was the most sensitive microorganism to all *Spirulina* SFE frac-

Table 4
Antimicrobial activities of different SFE extracts from *S. platensis*

Sample	<i>E. coli</i> MBC ^a	<i>S. aureus</i> MBC	<i>C. albicans</i> MBC	<i>A. niger</i> MBC
<i>Exp. 2</i>				
S1	15	20	10	>35
S2	20	20	15	>35
<i>Exp. 4</i>				
S1	20	20	10	>35
S2	10	10	10	35
<i>Exp. 5</i>				
S1	25	25	15	>35
S2	15	15	10	35
<i>Exp. 8</i>				
S1	25	25	15	>35
S2	20	20	10	>35
<i>Exp. 10</i>				
S1	30	25	15	>35
S2	20	20	10	>35
Exp. 12, S2	25	20	10	>35
Exp. 14, S2	25	20	15	>35
Exp. 15, S2	20	15	10	>35
Exp. 18, S2	25	20	10	>35
Exp. 20, S2	15	15	10	>35
Reference antibiotic	10	10	100	150

^a MBC, minimum bactericidal concentration. MBC values given as mg/ml for samples and µg/ml for antibiotic.

Table 5
GC-FID identification, peak and area contribution of fatty acid found in the SF extract (experiment 4) of *S. platensis*

Fatty acid	%area (sep. 1)	%area (sep. 2)	<i>t_R</i> (min)
Lauric acid, C12	3.53	19.2	5.84
Myristic acid, C14	2.89	1.38	7.95
Palmitic acid, C16	44.4	36.6	10
Palmitoleic acid, C16:1	5.92	5.80	10.3
Stearic acid, C18	7.22	8.93	14.0
Oleic acid, C18:1	30.6	25.06	14.6
Linoleic acid, C18:2	0.92	0.66	15.1

tions, with the lowest MBC values (15–10 mg/ml), whereas the least susceptible was the fungus *A. niger*. In fact, only two of the extracts tested were active against this fungus. *E. coli* and *S. aureus* were also sensitive to all *Spirulina* SFE fractions Table 5.

In the SFE extracts obtained using 10% ethanol as modifier, a higher antimicrobial activity (once ethanol was evaporated) was found in the fractions collected in the second separator (S2), with the exception of experiment 2, where the pressure employed for the extraction was the lowest. Comparing the results obtained with the S2 from the different experiments, the most active one, for all the microorganisms examined, was that of experiment 4 (220 bar, 27 °C), followed by fractions from experiment 5 (220 bar, 55 °C) and from experiments 8 (320 bar, 35 °C) and 10 (361 bar, 55 °C). These results showed that, when employing extraction pressures above 120 bar, the com-

pounds responsible for the antimicrobial activity are selectively collected in the second separator. Moreover, an extraction pressure equal to 220 bar seemed to be optimal to extract substances with antimicrobial activity, since higher pressure values gave less active fractions. Besides, as can be seen from a comparison between experiment 4 and 5, the increase of extraction temperature produced fractions with a lower antimicrobial activity.

In the SFE extracts performed without ethanol as modifier, the S2 from experiment 20 (361 bar, 55 °C) showed the highest antimicrobial activity, against all the microorganisms tested, followed by S2 from experiment 15 (220 bar, 55 °C). These data indicated that, when pure CO₂ was used as extractant, the best results in terms of antimicrobial activity were obtained by working at intermediate temperatures (55 °C) and medium-high pressures.

Cyanobacteria have been screened for potential antimicrobial activity, which have been attributed to different compounds belonging to a diverse range of chemical classes (Borowitzka, 1995; Kreitlow, Mundt, & Lindequist, 1999; Ozdemir et al., 2004). Specifically, the antimicrobial activity of a methanolic extract of the *S. platensis* was explained by the presence of γ -linolenic acid (Demule et al., 1996), an antibiotically-active fatty acid present in high concentration in this alga (Xue et al., 2002). In that way, a detailed study of FA content of the two fractions obtained from experiment 4, that provided the best antimicrobial activity, was performed by using GC-FID analysis (Table 5). Besides, Fig. 5 shows the GC chromatogram obtained for these two fractions. The data obtained showed that the percentage of linolenic acid found in both S1 and S2 were very low, and, consequently, the antimicrobial activity found in SF extracts could not be attributed to this fatty acid. However, since the fatty acid analysis indicated the presence of other fatty acids that have been also reported to have some antimicrobial activity, specifically lauric, palmitoleic and oleic acids (Benkendorff, Davis, Rogers, & Bremner, 2005; Ouattara, Simard, Holley, Piette, & Bégin, 1997), the antimicrobial activity found in SF extracts could be linked to a synergic effect of all these fatty acids. Comparing the analysis of fatty acids obtained in both fractions (S1 and S2), it must be noted that the percentage of lauric acid found in fraction 2 (S2) was much higher than that in fraction 1 (S1), a fact that could be related to the higher antimicrobial activity found in this fraction.

4. Conclusions

Data presented in this study illustrate that supercritical fluid extracts from *S. platensis* show antioxidant and antimicrobial activity. Consequently, *Spirulina* SF extracts present a promising potential as an accessible and safe alternative to synthetic antioxidants and antimicrobials. Besides, the process developed involves the use of an environmentally clean technology, i.e., supercritical fluid extraction.

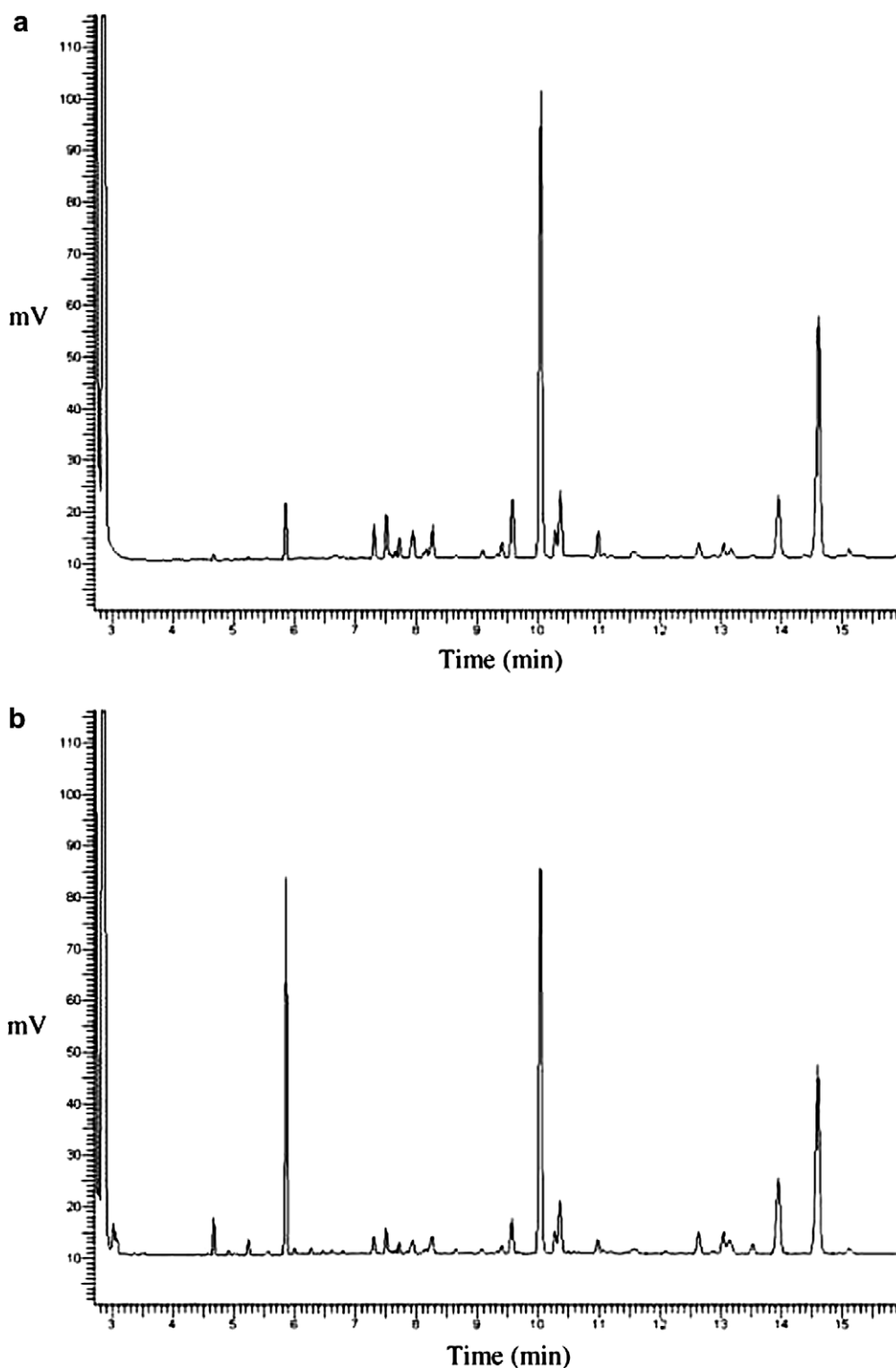


Fig. 5. GC-FID chromatogram of the supercritical CO₂ extract obtained at 220 atm and 27 °C (extract 4): (a) Separator 1 and (b) separator 2.

The optimal SFE conditions in terms of antioxidant activity were achieved in the first separator when using intermediate pressures and temperatures (220–320 bar, 55 °C) in the extraction with CO₂ plus 10% ethanol as cosolvent, whereas higher pressures and temperatures (320 bar, 75 °C) were

needed to obtain the highest antioxidant extract when pure CO₂ was used. For the antimicrobial activity, the most active fraction against all the microorganisms tested, was the one collected in the second separator in the experiment performed at 220 bar and 26.7 °C with 10% of ethanol.

In general, the extractions performed with 10% of ethanol as a cosolvent presented a higher antioxidant and antimicrobial activities than did those the ones obtained using pure CO₂. This fact, along with the higher yields obtained with the binary mixture, make this solvent optimal for the extraction of functional compounds from microalgae. From the present study, it can also be inferred that extraction at 220 bar and 55 °C yields the best extracts in terms of antioxidant and antimicrobial activities. Under these conditions, a good fractionation was also achieved, with preferential recovery of antioxidant compounds in separator 1 and antimicrobial components in separator 2.

Acknowledgements

J.A.M thanks the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) for a FPI grant. The authors thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Projects AGL2002-04621-C02-02 and AGL2005-06726-C04-01/ALI) for financial support. Project S-505/AGR-0153 (ALI-BIRD) granted by the Comunidad Autonoma de Madrid (Spain) is also acknowledged.

References

- Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T. W., & Ruprecht, R. M. (1998). Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 18, 7–12.
- Becker, E. W., & Venkataraman, L. V. (1984). Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass*, 4(2), 105–125.
- Benkendorff, K., Davis, A. R., Rogers, C. N., & Bremner, J. B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(1), 29–44.
- Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. (2000). C-Phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 275, 20–25.
- Bohm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., & Schwartz, S. J. (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 221–226.
- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7, 3–15.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.
- Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A., et al. (2001). Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. *Journal of Chromatography A*, 912, 61–71.
- Cocero, M. J., González, S., Perez, S., & Alonso, E. (2000). Supercritical extraction of unsaturated products. Degradation of β -carotene in supercritical extraction processes. *Journal of Supercritical Fluids*, 19(1), 39–44.
- Demule, M. C. Z., Decaire, G. Z., & Decano, M. S. (1996). Bioactive substances from *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *International Journal of Experimental Botany*, 58, 93–96.
- Dillon, J. C., Phuc, A. P., & Dubacq, J. P. (1995). Nutritional value of the alga *Spirulina*. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 77, 32–46.
- Gireesh, T., Jayadeep, A., Rajasekharan, K. N., Menon, V. P., Vairamany, M., Tang, G., et al. (2001). Production of deuterated β -carotene by metabolic labelling of *Spirulina platensis*. *Biotechnology Letters*, 23, 447–449.
- Hawthorne, S. B., Krieger, M. S., & Miller, D. J. (1988). Analysis of flavor and fragrance compounds using supercritical fluid extraction coupled with gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 60(5), 472–477.
- Hernández-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G., & Barron, B. L. (2002). Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral research*, 56, 279–285.
- Hirahashi, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Saeki, Y., Ui, M., & Seya, T. (2002). Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology*, 2, 423–434.
- Jaime, L., Mendiola, J. A., Herrero, M., Señorans, F. J., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., et al. (2005). Separation and characterization of antioxidant compounds from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC and HPLC-DAD. *Journal of Separation Science*, 28, 2111–2119.
- Kreitlow, S., Mundt, S., & Lindequist, U. (1999). Cyanobacteria—a potential source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology*, 70, 61–63.
- Marsili, R., & Callahan, D. (1993). Comparison of a liquid solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of α - and β -carotene in vegetables. *Journal of Chromatographic Science*, 31(10), 422–428.
- Mendes, R. L., Fernandes, H. L., Coelho, J. P., Reis, E. C., Cabral, J. M. S., Novais, J. M., et al. (1995). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*, 53, 99–103.
- Mendes, R. L., Nobre, B. P., Cardoso, M. T., Pereira, A. P., & Palavra, A. F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 328–334.
- Mendiola, J. A., Marín, F. R., Hernández, S. F., Arredondo, B. O., Señorans, F. J., Ibáñez, E., et al. (2005). Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga. *Journal of Separation Sciences*, 28, 1031–1038.
- Miranda, M. S., Cintra, R. G., Barros, S. B., & Manchini, F. J. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 31, 1075–1079.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (9th Int. Suppl.) M 100-S9, Wayne, PA.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., & Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155–162.
- Ozdemir, G., Karabay, N. U., Dalay, M. C., & Pazarbasi, B. (2004). Antibacterial activity of volatile components and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research*, 18, 754–757.
- Piñero Estrada, J. E., Bermejo Bescós, P., & Villar del Fresno, A. M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *II Farmaco*, 59, 497–500.
- Quach, H. T., Steeper, R. L., & Griffin, G. W. (2004). An improved method for the extraction and thin-layer chromatography of chlorophyll a and b from spinach. *Journal of Chemical Education*, 81, 385–387.
- Robles Medina, A., Molina Grima, E., Giménez Giménez, A., & Ibáñez Gonzalez, M. J. (1998). Downstream processing of microalgal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnological Advances*, 16, 517–580.
- Señorans, F. J., Ibáñez, E., Caverro, S., Tabera, J., & Reglero, G. (2000). LC/MS analysis of supercritical fluid extracts from rosemary plants. *Journal of Chromatography A*, 870, 491–499.
- Subhashini, J., Mahipal, S. V. K., Reddy, M. C., Reddy, M. M., Rachamalla, A., & Reddanna, P. (2004). Molecular mechanisms in C-

- Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical Pharmacology*, 68, 453–462.
- Subra, P., Castellani, S., Jestin, P., & Aoufi, A. (1998). Extraction of β -carotene with supercritical fluids. Experiments and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, 12, 261–269.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: An introduction to phycology* (12–13 ed.). Cambridge University Press.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117.
- Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang, Z., Li, Z., Cai, Y., et al. (2002). Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77, 9–13.

Review

Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications

José A. Mendiola^a, Miguel Herrero^b, Alejandro Cifuentes^b, Elena Ibañez^{b,*}

^a *Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain*

^b *Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain*

Available online 20 February 2007

Abstract

This review attempts to provide an updated overview (including works published till June 2006) on the latest applications of compressed fluids as sample preparation techniques for food analysis. After a general review of the principles of supercritical fluid extraction (SFE) and pressurized liquid extraction (PLE; also called accelerated solvent extraction, ASE or subcritical water extraction, SWE, when water is employed as extraction solvent), the principal applications of such techniques in the mentioned fields of food and natural products are described, discussing their main advantages and drawbacks.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Supercritical fluid extraction; Pressurized liquid extraction; Subcritical water extraction; Foods; Natural products; Functional foods

Contents

1. Introduction	234
2. Applications of SFE and PLE in food analysis and natural products analysis	236
2.1. Functional compounds	236
2.1.1. SFE applications	236
2.1.2. PLE applications	238
2.2. Food safety	241
2.2.1. SFE applications	241
2.2.2. PLE applications	242
3. Conclusions and future outlooks	244
Acknowledgements	244
References	244

1. Introduction

The demand on new analytical techniques in food and environmental sciences is strongly related to the higher demand of information on processing, quality control, adulteration, contamination, environmental and food regulations, etc. Consequently, faster, more powerful, cleaner and cheaper analytical procedures are required by chemists, regulatory agencies and quality control laboratories to meet these demands. In this regard, the progress in modern analytical techniques has led to significant improvements in the quality of analysis;

however, the importance of sample preparation has been often under-estimated.

Traditionally, several techniques have been used for sample preparation involving extraction with organic solvents, column fractionation, etc. These are usually time-consuming and labor-intensive, introducing potential quantitative errors and using large volumes of organic solvents, with the associated risks for the human health and the environment. Consequently, several alternative techniques for sample preparation have been developed to solve these problems. The techniques discussed in the present review are based on the use of compressed fluids as extracting agents; examples of such techniques are: supercritical fluid extraction (SFE), pressurized liquid extraction (PLE) or accelerated solvent extraction (ASE) and subcritical water extraction (SWE). Thus, the scope of the present review is to

* Corresponding author. Tel.: +34 91 5618806x385; fax: +34 91 5644853.
E-mail address: elena@ifi.csic.es (E. Ibañez).

present the main applications of such techniques in food and natural products.

One of the main advantages of SFE [1–6] in sample preparation is the reduced use of organic solvents (zero in many cases) allowing to perform extractions with nonpolluting, nontoxic supercritical fluids, such as carbon dioxide, which is the most widely used extracting solvent. Carbon dioxide (critical conditions = 30.9 °C and 73.8 bar) is cheap, environmental friendly and generally recognized as safe by FDA and EFSA. Supercritical CO₂ (SC-CO₂) is also attractive because of its high diffusivity combined with its easily tunable solvent strength. Another advantage is that CO₂ is gaseous at room temperature and pressure which makes analyte recovery very simple and provides solvent-free analytes. Also, important for food and natural products sample preparation, is the ability of SFE using CO₂ to be operated at low temperatures using a non-oxidant medium, which allows the extraction of thermally labile or easily oxidized compounds. Other solvents are or have been under study but most of them showed several drawbacks such as, for example, the high critical temperature and pressure for water; the high flammability of nitrous oxide, ethers and hydrocarbons; and the chemical reactivity and corrosiveness of ammonia [7]. An important drawback of SFE is that predominantly, a non-polar extraction fluid, such as CO₂, is used. Therefore, a logical trend to widen the application range of this technique is the study of new methods to decrease analyte polarity to make them more soluble in non-polar supercritical fluids. In this sense, chemical *in situ* derivatization has been applied [8,9] to improve the selectivity of the extraction towards a specific group of compounds. Nevertheless, a more common practice in SFE is to change the polarity of the supercritical fluid and increase their solvating power towards the analyte of interest by employing polar modifiers (co-solvents). For example, the addition of relatively small percentages (1–10%) of methanol to carbon dioxide expands its extraction range to include more polar analytes [10]. The modifiers can also reduce the analyte–matrix interactions improving their quantitative extraction.

In SFE, there are several aspects related to the sample matrix and to analyte recovery that should be carefully considered to achieve a quantitative extraction of the analytes of interest from the food matrix. In terms of the sample matrix, a different approach has to be used if solid or liquid samples have to be extracted; for solid samples, a previous step of drying [11], freeze drying [12], grinding and/or mixing with an inert agent like sea sand [13] or alumina should be included. For liquid samples, two different strategies have been used such as the absorption of the sample onto a porous and inert substrate [14] or the co-injection of the sample with the supercritical fluid in the extraction vessel as supercritical anti-solvent precipitation or in a countercurrent packed column [15,16].

Analyte recovery is one of the main factors involved in the reproducibility of SFE as sample preparation method. Optimization of the main factors involved in the effectiveness of a trapping method such as analyte volatility and polarity, volatility of the extracting agent, volatility of modifier (if used), solvent flow rate, and so on, is mandatory to avoid unwanted losses

of extracted compounds. Different trapping methods have been used for collecting analytes after SFE; basically solid trapping, liquid trapping and a combination of both have been described. The usefulness and advantages of each of them will be discussed in the appropriate section.

To achieve the quantitative extraction of the target analytes in SFE it is necessary to consider both, the rate of the analyte diffusion from a sample matrix to a supercritical phase and the solubility of the analyte in the supercritical fluid at the selected conditions. Usually, when real samples are considered, the analyte diffusion is a limiting step since analytes are bound to the matrix and therefore are difficult to extract in a short time. In such cases, it is recommended to include a static extraction time until a steady state is reached. During the dynamic extraction, fresh supercritical fluid is passed through the sample thus extracting the compounds based on their solubility in the supercritical fluid. Usually, when static extraction is used, it is followed by a dynamic extraction step [10].

Since no discussion will be included in this review about the on-line coupling of SFE with different separation techniques, some reviews dealing with this topic are suggested [17,18].

In PLE, pressure is applied to allow the use as extraction solvents of liquids at temperatures greater than their normal boiling point. Among them, ASE (which can be considered a new version of the Soxhlet apparatus but operating at high pressures and temperatures), pressurized hot water extraction (PHWE) or SWE, near-critical fluid extraction and enhanced fluidity extraction are the most promising techniques in food sample preparation [1,19–26].

The increase on the extraction temperature can promote higher analyte solubility by increasing both, solubility and mass transfer rate. Besides, the high temperatures decrease the viscosity and the surface tension of the solvents, which helps to reach areas of the matrices more easily, improving the extraction rate. The PLE processes can be carried out in both dynamic and static mode, as SFE. The static mode has been the most utilized and is the more frequent when using commercial instruments. The dynamic mode, presumably, could improve the extraction rate by allowing a better contact between the matrix and fresh solvent pumped in a continuous way through the extraction cell and is used mainly with lab-made devices.

The combined use of high pressures and temperatures provides faster extraction processes that require small amounts of solvents (e.g., 20 min using 10–50 ml of solvent in PLE can be compared with a traditional extraction step in which 10–48 h and up to 200 ml are required) decreasing in this way the dilution of the sample. Besides, PLE is broadly recognized as a green extraction technique due to the low organic solvent consume.

Method development in PLE is simpler than in SFE since only two parameters are important to optimize the process, once the solvent has been selected, which are the extraction temperature and time [27]. As it will be discussed later in the applications, other aspects have to be considered such as the arrangement of the sample inside the extraction vessel and the collection of the analytes. In PLE the analyte recovery is not as critical as in SFE, since in most of the automatic systems employed the solute is recovered in solution in a closed vial minimizing solute losses.

Of course, for highly volatile compounds recovery, a cooling step should be included.

The use of water as extraction solvent in PLE, in the so-called subcritical water extraction, can undoubtedly enhance even more the consideration of PLE as an environmentally friendly procedure [28,29]. Subcritical water is obtained in pressurized systems at temperatures ranging from 100 to 374 °C (which is the water critical temperature) and has been suggested to extract polar and medium polar compounds. SWE is based on the same principles as PLE and employs the same type of instrumentation at temperatures up to 200 °C. The main interest in the use of water as extracting agent is related to its physico-chemical properties that change dramatically by increasing the temperature. Among the different properties of interest for an extraction process, the most useful is the change in the dielectric constant of the water with the temperature that leads water to behave like an organic solvent when heated at, for example, 200 °C (dielectric constant equal to 36 which is close to methanol).

Readers interested in a deeper physico-chemical description of PLE and SWE extraction techniques can find it elsewhere [3,10,21,27].

2. Applications of SFE and PLE in food analysis and natural products analysis

2.1. Functional compounds

Nowadays, the growing interest in the so-called functional foods has raised the demand of new functional ingredients that can be used by the food industry [1]. These functional ingredients are preferred to have natural origin and to have been obtained using environmentally clean extraction techniques. As expected, the complexity of the natural ingredients with biological activity is very high; this fact has led to the development of new methodologies to extract and characterize them. In order to preserve the activity of such ingredients and to prevent changes in the chemical composition of the functional compounds and/or mixture of compounds, sample preparation techniques based on the use of compressed fluids have been widely developed.

2.1.1. SFE applications

Table 1 shows a summary of the main applications of SFE in food and natural products analysis. SFE has been used to obtain extracts with antioxidant activity from microalgae [30,31,70,71]; by using the combination of SFE and HPLC with both, diode array detection (DAD) and electrospray-mass spectrometry (ESI-MS), several functional compounds were identified corresponding to different carotenoids along with chlorophyll a and some chlorophyll degradation products. These compounds could be associated to the biological activity of such extracts. Supercritical CO₂ has also been used to extract and characterize antimicrobial compounds and food preservatives from microalgae. Mendiola et al. [71] correlated the antimicrobial activity of *Chaetoceros muelleri* supercritical extracts with its content in docosapentaenoic acid (DPA) and triglycerides, analyzed by HPLC–ELSD (evaporative light scattering detector). A common important point to remark is the low yields

obtained in these works [30,31,70,71]. In case of *Chaetoceros*, these low extraction yields are due to its siliceous cell wall, a common characteristic to the diatomaceous microalgae [71]. In case of *Spirulina* [30,70], and many other microalgae [31], the main problem in order to obtain higher extraction yields is its high proteins and carbohydrates content, which are almost insoluble in supercritical CO₂.

Carotenoids are a group of compounds of great importance to human health since they can act, e.g., as potent antioxidants; however, due to their chemical characteristics they are easily degraded by temperature or oxygen, so, the use of SFE has been suggested to minimize risks of activity lost being thus applied to the extraction of carotenoids from different matrices. Sun et al. [32] carried out the extraction of carotenoids from carrot and compared the traditional solvent extraction method with the SFE using canola oil as co-solvent. Results showed that not only hydrocarbon compounds such as α - and β -carotene were recovered by supercritical CO₂ but also oxygenated carotenoids such as lutein. The authors suggested that the use of canola oil as co-solvent greatly increased the extraction yield of carotenoids. Similar results were obtained for the SFE of lycopene from tomato [33]; in this application, a vegetable oil was also used as co-solvent showing an improvement in the extraction yield as well as in the stability of the pigment. In both cases, the use of oils as co-extracting agents presents an important drawback: the elimination of oil. It helps to improve the extraction but the extract is a mixture of the extracted components of the oil and the “pure” extract. On the other hand, López et al. [34] developed a highly selective automated SFE method for the isolation of carotenoids from crustaceans by using 15% ethanol as cosolvent. One of the main parameters optimized in this work was the trapping of the analytes in a solid trapping device; factors such as the trapping polarity and the trap temperature were optimized. Authors selected an ODS (C₁₈) trap heated at 80 °C in order to trap the analytes while avoiding the condensation of the organic modifier in the trap. The solutes were later eluted with acetone at 30 °C.

Another compound with antioxidant properties that has also been extracted with supercritical carbon dioxide has been squalene from different matrices such as olive oil [16,36], oil raffination by-products [72,73] and from different plants [37]. In all the cases the extract could be directly analyzed using liquid chromatography with no other fractionation step. An important point in favor of SFE in the obtention of squalene is the relatively short extraction times, mild pressures (~200 bar) and temperatures (~50 °C) used.

Simó et al. [15] developed a method to extract and characterize antioxidants from orange juice based on SFE followed by a chemical characterization of the extracts using micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and HPLC-MS. The main advantage of MEKC, that is, its high separation speed, can facilitate the rapid optimization of countercurrent-SFE (CC-SFE) conditions. In this case SFE provided three fractions with different composition in each extraction, which lasted only 20 min. No other cleanups were needed in the present work where a full characterization of the antioxidants in oranges could be achieved in less than 1 h.

Table 1
Applications of SFE as sample preparation in foods and natural products analysis

Compound of interest	Sample	Pre-SFE treatment	Solvent	P (bar) ^a / T (°C)/ t (min)	Analytical technique	Ref.
Carotenoids						
Carotenoids and chlorophylls	<i>Spirulina platensis</i>	No	CO ₂ + ethanol	80–360/55/75	HPLC–MSMS	[30]
β-Carotene	<i>Synechococcus</i>	Freeze dry and sonication	CO ₂ + ethanol	200–400/40–60/120	HPLC	[31]
Carotenoids	Carrots	Freeze dry, ground	CO ₂ + canola oil	270–550/40–70	HPLC–DAD	[32]
Lycopene	Tomato	Dry and ground	CO ₂ + vegetable oil	335–445/45–70/360	HPLC–UV	[33]
Astaxanthin	Crustaceans	Ground, diatomaceous earth dispersion	CO ₂ + ethanol	200/60/15	HPLC–UV	[34]
Oils, fats and lipids						
Total fats and fat-soluble vitamins	Parmigiano cheese and salami	Dry and blend	CO ₂ + methanol	535.7/100/40	HPLC	[11]
Sterols, vitamin E, squalene	Olive oil	No	CO ₂	75–200/35–50/continuous	TLC, GC–MS	[16]
Cholesterol	Cattle brain	Freeze-dried	CO ₂	250/60/300	GC–FID, NMR, IR	[35]
Sterols, vitamin E, squalene	Olive oil	No	CO ₂	200/40/continuous	HPLC–DAD	[36]
Squalene	<i>Terminalia catappa</i> leaves and seeds	Freeze dry	CO ₂	137–275/40–60/15	GC–MS, HPLC–UV	[37]
Onion oil	Onion	Ground and filter	CO ₂	100–280/37–50	GC–MS	[38]
Cinnamon oils	<i>Cinnamomum cassia</i>	Ground	CO ₂	225/50	GC–MS	[39]
Essential oils	Horsetail (<i>Equisetum giganteum</i> L.)	Dried, and homogenized	CO ₂	120–300/25–35/800	GC–MS	[40]
Essential oil	St. John's wort	Ground	CO ₂ + methanol	80–100/15–40/–	GC–MS	[41]
Fat	Infant formula powder	No	CO ₂	465/100/–	GC–MS and gravimetry	[42]
Fat	Fermented Cupuaçu seeds	No	CO ₂ and ethane	250–350/50–70/–	HPLC	[43]
Oils	<i>Theobroma grandiflorum</i> Oilseeds	Ground	CO ₂ + acetone	660/40/60	GC	[44]
Phenolic compounds						
Polyphenolic compounds	Grape skin	No	CO ₂ + ethanol	250/60/18	HPLC–DAD	[45]
Coumarins	Citrus maxima fruit	No	CO ₂ + acetone	276/50/–	HPLC	[46]
Turmerones	<i>Curcuma longa</i> Linn	Ground	CO ₂	100–340/35–83/–	NMR, HPLC	[47]
Isoflavones	Red clover and soy bits	Ground	CO ₂ + methanol:water (9:1)	35–75/10–40/–	Ultra fast HPLC–UV–MS	[48]
Other food compounds of interest						
Antimicrobial compounds	Oregano	Ground	CO ₂ + ethanol	150/40/60	GC–MS	[13]
Antioxidant compounds	Orange juice	No	CO ₂	160/40/continuous	MECK, LC–MS	[15]
Antimicrobial compounds	Rosemary	Ground	CO ₂ + ethanol	250/60/60	GC–MS	[49]
Antioxidant and antimicrobial compounds	Bay leaves (laurel)	Ground	CO ₂ + ethanol	250/60/75	GC–MS	[50]
Volatile components	<i>Bunium persicum</i> Boiss. (black cummin)	Ground	CO ₂	200/45/–	GC–MS	[51]
Hypericin, hyperforin	St. John's wort	Separation, lyophilization, homogenization.	–	–	GC–MS, HPLC–DAD and HPLC–DAD–MS	[52]
Aurentiamide acetate	<i>Patrinia villosa</i> Juss	No	CO ₂ + methanol	150–350/45–65/60	HPLC and high-speed counter-current chromatography-(UV, MS, 1H NMR and 13C NMR)	[53]
Volatile components	Wine	SPE	CO ₂	200/50/45	GC–FID	[54]
Lignans and cinnamic acid	<i>Schizandra chinensis</i>	No	CO ₂	20–27/40–60/–	HPLC–UV	[55]
Pesticides						
Pesticides	Apple, green bean, and carrot	Dry	CO ₂	320/60/30	GC–MS	[56]
Organohalogenated and organophosphate pesticides	Vegetable soup (gazpacho)	Dry with magnesium sulphate	CO ₂	300–500/50–90/20	GC–PFD–ECD–MS	[57]
Organophosphorus, Organohalogenated, Organonitrogen and Pyrethroids Pesticides	Potatoes, tomatoes, apples and lettuce	Ground, dehydrated	CO ₂ + acetone/methanol	200–700/70/25	GC–ECD, GC–MS	[58]

Table 1 (Continued)

Compound of interest	Sample	Pre-SFE treatment	Solvent	P (bar) ^a /T (°C)/t (min)	Analytical technique	Ref.
Pesticides multiresidue	Honey	Freeze dry pre SFE and SPE post SFE	CO ₂ + acetone/acetonitrile	200–600/40–90	GC–MS	[59]
Organophosphorus, Organohalogenated, Organonitrogen and Pyrethroids Pesticides	Cereals, cereal products, vegetables and fruits	Dry	–	–	GC–ECD, GC–NPD	[60]
Organohalogenated pesticides	Fish muscle	Dry and freeze dry	CO ₂	100–240/36–64	GC–ECD	[61]
Organohalogenated pesticides	Infant food	Dehydrated	CO ₂	170/70/190	GC–MS	[62]
Other food pollutants	Chicken liver, beef liver, and pig kidney	No	CO ₂ + methanol	70–207/40–160/20	HPLC–UV and HPLC–amperometric	[14]
Sulfonamides	Poultry feed	No	CO ₂ + several modifiers	275/50/–	HPLC fluorescence, normal phase	[63]
Lasalocid (veterinary drug)	Vegetable oil	No	CO ₂ + acetonitrile	283/110/50	HPLC fluorescence	[64]
PAH	Smoked fish/milk	Mix with C ₁₈ and dry	CO ₂	300/100/–	GC–MS	[65]
PAH/anti-cancer agents	Sardine and chicken liver	Freeze dry	CO ₂	300/110/–	GC–ECD, GC–MS	[66]
p,p'-DDE and PCB	Ground beef	Ground	CO ₂ + methanol	375/75/80	GC–MS	[67]
2-Dodecylcyclobutane as an irradiation dose indicator	Identification of adulteration of black pepper with papaya seeds	Ground	CO ₂	165–355/45–80/60	TLC GC–MS	[68]
Polychlorinated and polybrominated contaminants	Aquaculture fish feed and cultured marine species	Ground, freeze dry and SPME	–	165/60	GC/MS/MS	[69]

^a Most commonly employed pressure units in SFE.

SFE has been widely used as sample preparation method to analyze essential oils from foodstuffs like onions [38], or from different herbaceous materials like oregano [13], rosemary [49], laurel (bay leaves) [50], cinnamon [39], cumin [51], horsetail (*Equisetum giganteum* L.) [40] or St. John's wort (*Hypericum* sp.) [41,52]. Essential oils are not only valuable as aroma but also some of them are highly appreciated as functional ingredients with different activities: antioxidant (oregano), antimicrobial (rosemary), antidepressant (St. John's wort). In general terms, the use of SFE allows the analysis of essential oil preserving its integrity, without the formation of off-flavors that could interfere in the characterization of the sample as was demonstrated by Statshenko et al. [74].

As mentioned, to widen the range of application of SFE to relatively polar compounds, small amounts of modifiers ($\leq 15\%$) are added to carbon dioxide allowing the extraction of more polar substances. Examples of functional compounds of relatively high polarity that have been extracted using SFE with polar modifiers are: polyphenols from grape skin [45], from grapefruit (*Citrus maxima*) [46] and from other fruits like *Forsythia koreana* [75]. There are two main procedures to work with modifiers in SFE: the first one, and the most common, accounts for a mixing of the modifier with the CO₂ flow [34,42,45,53] while the second mixes the modifier with raw material in the extraction cell [33,71]. This procedure is always associated to a static extraction step in which the modifier, in intimate contact with the sample matrix, is able to substitute the analyte molecules bound in active centers of the matrix and release them into the supercritical fluid phase.

Other examples of the extraction of valuable compounds from foods using SFE are the isolation of cholesterol from cattle brains [35,76] and fat soluble vitamins from parmigiano regiano cheese [11]. In this work, trapping of the vitamins is carried out using a liquid trapping isopropyl ether:ethanol 1:1 which allows the complete recovery of the extracted analytes. The main problem with cattle brains, as well as many other raw food matrices is its high content in water. Water can interfere in the extraction process in two ways: lixiviation or acting as co-solvent thus interfering in the reproducibility of the extraction procedure. In order to avoid this situation, the most common strategy is drying [33,40,56] or freeze drying the sample prior to extraction although some authors prefer to mix the sample with a water absorbent inside the extraction cell, for example magnesium sulphate [57]. Another problem related to the extraction of real food samples is their variable fat content which can also interfere in the extraction of the target compounds due to a co-extraction of the fat at the selected extraction conditions. Two main approaches have been used to overcome this problem, the first one uses a fat retainer, mainly basic alumina, neutral alumina, florisil or silica, placed in a separate chamber downstream the extraction thimble, while the other one uses the fat retainer inside the extraction cell.

2.1.2. PLE applications

As for PLE, numerous applications have been developed in the last few years involving the extraction of interesting compounds from foods and natural matrices; Table 2 shows a

Table 2
Applications of PLE as sample preparation in foods and natural products analysis

Compound of interest	Sample	Pre PLE treatment, dispersion agent	Solvent	T (°C)/P (psi) ^a /t (min)	Mode/Cycles	Analytical technique	Ref.
Carotenoids and tocopherols							
Carotenoids	<i>Dunaliella salina</i>	Sea sand layered	Ethanol	160/1500/17	Static—1	HPLC–DAD	[77]
Carotene, tocopherols	Palm oil		Hexane	80/1500/10	Static—2		[78]
Tocopherols	Seeds and nuts		Acetonitrile	50/1600/5	Static—2	HPLC–ED	[79]
Tocopherol	Hazelnut	Hydromatrix	Hexane (0.01% BHT)	60/1500/15	Static—1	HPLC–UV	[80]
Carotenoids	Different foods	Hydromatrix	Methanol/ethyl acetate/light petroleum 1:1:1 (v/v/v)	40/1000/2	Static—3	HPLC–DAD	[81]
Carotenoids	Microalgae	Sea sand layered	Acetone	20/1500/5	Static—2	HPLC	[82]
Essential oils							
Essential oil	<i>Fructus amomi</i>		Water	150/725/5	Dynamic (1 ml/min)	SPME–GC–MS	[83]
Essential oil	<i>Achillea monocephala</i>	Glass wool	Water	150/870/20	Dynamic (2 ml/min)	GC–TOF–MS	[84]
Essential oil	<i>Thymbra spicata</i>	Glass wool	Water	150/870/15	Dynamic (2 ml/min)	GC–TOF–MS	[85]
Volatiles	<i>Ziziphora taurica</i>	Glass wool	Water	150/870/30	Dynamic (2 ml/min)	GC–GC/TOF–MS	[86]
Essential oil	<i>Origanum onites</i>	Glass wool	Water	150/870/30	Dynamic (2 ml/min)	GC–GC/TOF–MS	[87]
Lipids							
Fatty acids	Wheat germ oil		Hexane	105/1500/5	Static—3	GC	[88]
Lipids	Poultry meat	Hydromatrix	Chlorophorm/methanol 2:1 (v/v)	120/3000/10	Static—2	TLC, GC	[89]
Saponins and fatty acids	<i>Ziziphus jujube</i>	Diatomaceous earth	Methanol/ethyl acetate 95:5 (v/v)	140/1200/15	Static—2	HPLC–ESLD	[90]
Phenolic compounds							
Anthocyanins/Phenolic compounds	Grape skin		Acidified water	80–100/1500/5	Static—3	HPLC	[91]
Catechins	Grape seeds	Sea sand	Ethanol	130/1500/10	Static—1	HPLC–DAD	[92]
Phenolic compounds	Grapes	Sea sand	Methanol	100/600/10	Static—3	HPLC	[93]
Catechin, proanthocyanidins	Winery by-products		Water	50–100/900–1000/30	Dynamic (1 ml/min)	HPLC–DAD–MS	[94]
Isoflavones	Soybean	Sea sand	Ethanol/water 70:30 (v/v)	100/1500/7	Static—3	HPLC–DAD–MS	[95]
Isoflavones	Soybean foods	Filter paper wrapping and SFE matrix	Methanol/water 9:1 (v/v)	145/–/7	Static—2	HPLC–MS	[96]
Phenolic compounds	Parsley	Ottawa sand	Methanol/water 65:35 (v/v)	100/1000/10	Static	HPLC	[97]
Phenolic acids	<i>Cimicifuga racemosa</i>	Celite 545	Methanol/water 60:40 (v/v)	90/1000/5	Static—2	HPLC–MS	[98]
Polyphenols	Hops	Diatomaceous earth	Pentane	60/1500/10	Static—2	HPLC–UV	[99]
			Acetone/water 4:1 (v/v)	60/1500/10	Static—1		
Proanthocyanidins	Malt	Neutral glass	Ethanol/water 80:20 (v/v)	140/870/10	Static—1	HPLC	[100]
Flavonols	<i>Sambucus nigra</i>	Sea sand	Water	100/1500/60	Dynamic (1 ml/min)	HPLC–ESI–MS	[101]
Phenolic diterpenes	Sage		Methanol	120/1500/5	Static—1	GC–MS	[102]
11 sesquiterpenes	<i>Curcuma</i> sp.		Water	25–200/600–1000/30	Dynamic (1 ml/min)	HPLC	[103]
Flavonoids	Rosemary		Water	100/1500/25	Static—1	CE–MS	[104]
Medicinal plants							
Anthraquinones	Rubarb	Diatomaceous earth	Methanol	140/1500/5	Static—1	CZE	[105]
Anthraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>		Water	220/1000/180	Dynamic (4 ml/min)	UV–Vis	[106]
Ligustilides	<i>Ligusticum chuanxiong</i> and <i>Angelica sinensis</i>		Water	150/600/10	Dynamic (2 ml/min)	SPME–GC–MS	[107]

Table 2 (Continued)

Compound of interest	Sample	Pre PLE treatment, dispersion agent	Solvent	T (°C)/ P (psi) ^a / t (min)	Mode/Cycles	Analytical technique	Ref.
Different compounds	<i>Piper gaudichaudianum</i>	Diatomaceous earth	Petroleum ether	85/1500/10	Static—1	GC-MS	[108]
Limonoid derivatives	<i>Cortex dictamnii</i>		Methanol	150/1500/5	Static—1	HPLC-DAD	[109]
Different compounds	Medicinal plants		Water	100/200–500/40	Dynamic (1 ml/min)	HPLC	[110]
Other food and natural matrices							
Antioxidants	<i>Spirulina platensis</i>	Sea sand	Ethanol	111/1500/15	Static—1	HPLC-MS	[20]
Capsaicinoids	Peppers		Methanol	200/1500/5	Static—1		[111]
Caffeine	Green tea/Coffee	Glass beads	Water	100/900/10	Static—1	HPLC	[112]
Phycobiliproteins	<i>Spirulina platensis</i>		Water	25/1500/15	Static—7	CE-MS	[113]

^a Most commonly employed pressure units in PLE.

summary of the most remarkable applications of PLE in this area. Probably, the main reason of the extremely important development of PLE-based techniques is the possibility of its automation along with the reduced extraction time and solvents required.

PLE has also been used to extract functional compounds from microalgae. For example, *Dunaliella salina*, a green microalga generally used as a natural source of carotenoids, has been extracted by PLE in order to obtain carotenoids [77,82]. In these works, authors demonstrated the possibility to obtain this kind of compounds from *Dunaliella salina* in a fast and efficient way by means of PLE. Namely, the direct extraction of the freeze dried material was possible filling the extraction cell with successive layers of sea sand–microalga–sea sand to avoid the clogging of the system [77,82]. Regarding microalgae, other species have been also studied for their interest as potential source of functional compounds. For example, the microalga *Spirulina platensis* has been also investigated as natural source of different functional compounds together with PLE using different solvents such as hexane, petroleum ether, ethanol and water [20,113]. One of these applications used capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE–MS) to monitor the optimization of the extraction of phycobiliproteins from this microalga [113]. Different extraction parameters were studied and the optimized conditions included a distribution of the sample inside the extraction cell in nine packs and the use of glass beads between them as supporting material. Using this configuration for the sample distribution, it was possible to carry out seven-cycle pressurized extractions without clogging the system. The final extraction yield after the optimization process was increased more than five times.

Likewise, the extraction of β -carotene (vitamin A precursor) as well as other carotenoids from different sources has been studied [78,81]. For this purpose, in general, low polarity solvents were used (hexane, light petroleum).

As mentioned, another important group of compounds with biological activity that can be found in several plants and food by-products are phenolic compounds. They are widely distributed in plants [20] and possess different functional activities mainly associated to their antioxidant properties. PLE has been widely employed as sample preparation technique to obtain phenolic compounds from grape seeds and other winery by-products [91–93]. Water has been used to perform these extractions [91,94] as well as organic solvents such as ethanol and methanol [92,93]. Palma et al. [93] developed a new method based on the use of solid phase extraction (SPE) combined with PLE. The configuration consisted in a solid phase cartridge placed at the bottom of the extraction cell and covered by a cellulose filter; the sample was deposited on top of the filter. Using this new procedure, it was possible to obtain an in-line clean up of a grape extract that could be directly analyzed by HPLC to determine its phenolic content. Other matrix that has been often used is soybean, mostly to obtain isoflavones, a kind of phenolic compounds highly appreciated because of their functional properties. Different approaches have been applied to extract isoflavones from soy by PLE [95,96]. In general, mixtures of organic solvents and water are selected at high extraction temperatures to

provide good extraction efficiencies. Klejdus et al. [96] tested the effect of the distribution of the sample into the extraction cell in the reproducibility of the extraction method. They placed subsequent layers of a filter paper–absorbent cotton–commercial matrix–sample (in a filter paper envelope)–matrix and absorbent. Using this distribution, it was possible to obtain clean extracts without other undesirable interferences. The extracts were only evaporated and re-dissolved before LC–MS analysis. Other phenolic compounds have also been extracted using PLE from different raw materials such as parsley [97], rosemary [114], brewing products as hops [99] and malt [100] or other different plants [98,101]. The possibility of performing two sequential PLE extractions to partially clean up the sample was implemented by Papagiannopoulos et al. [99]. With the aim to analyze polyphenols from hops, a two-cycle pressurized pentane extraction was carried out followed by a pressurized acetone extraction. In this way, several interfering compounds (mainly hop oils, resins and chlorophylls) could be eliminated and the final acetone extract could be on-line extracted by solid phase extraction before HPLC analysis. On the other hand, Ibáñez et al. [114] studied the selectivity of subcritical water to extract the most active compounds from rosemary by means of a home-made PLE device. In this work, HPLC monitoring of the relative amounts of several interesting compounds was carried out. The study showed that the selectivity of subcritical water towards the extraction of antioxidants could be easily tuned considering small changes in the extraction temperature. Similar results were found using a commercial PLE instrument characterizing the extracts in this case by CE–MS [104]. Besides rosemary, the antioxidant activity and chemical composition of subcritical water extracts, obtained from other plants such as sage [102] and oregano [115] have been studied. From the latest work [115], it could be concluded that subcritical water efficiency to extract antioxidant compounds is better than that of other organic solvents or hydro-organic mixtures.

Essential oils from different plant materials have been extracted using pressurized hot water [83–86]. By combining dynamic extractions and high temperatures (150 °C), recoveries obtained using SWE were comparable with those provided by traditional extraction techniques, such as steam distillation and Soxhlet extraction, but in a much faster and environmentally clean way [86]. Moreover, other less polar compounds have been extracted under pressurized liquid conditions, such as different fatty acids and other lipids from different food products [88,89] and plants [90]. In general, low polarity solvents such as hexane and chloroform/methanol as well as several static extraction cycles are used; once the extraction process is finished, the extracts are ready for GC analysis. Toschi et al. [89] compared the extraction of lipids from poultry meat considering PLE and different traditional methods, and determined that the use of PLE allowed recoveries around 98%, using one third of solvent volume and reducing the extraction time by more than 1 h (compared with traditional methods).

Due to the interest in the correct determination of the vitamin content of certain foods and natural products, PLE has been used to extract and analyze the vitamin E content in different matrices [78–80]. For example, Sivakumar and Bacchetta [80] optimized

the extraction of vitamin E from hazelnuts using hexane at 60 °C and adding 0.01% butyl hydroxy toluene (BHT) to the solvent to prevent tocopherol oxidation.

Other compounds, such as anthraquinones [105,106], as well as other active compounds from foods [111,112] and medicinal plants [87,103,107–110] have also been extracted by PLE prior to their analysis.

2.2. Food safety

At present, food safety includes many different issues such as detection of frauds, adulterations, contaminations, etc. Among these topics, detection of food pollutants is important not only for consumers but also for administrations, control laboratories, and regulatory agencies. In order to protect consumers' health, regulations establish strict limits to the presence of pollutants in foods that must be carefully observed and determined. Generally, the analysis of food pollutants is linked to long extraction and cleanup procedures commonly based on the use of, e.g., soxhlet and/or saponification. These procedures are laborious and time consuming and, besides, usually employ large volumes of toxic organic solvents. With the objective of reducing both, the sample preparation time and the massive use of organic solvents, techniques based on compressed fluids such as SFE and PLE have been developed.

2.2.1. SFE applications

One of the main areas of application of SFE in the last few years has been in food pollutants analysis, mainly pesticide residues and environmental pollutants (summary in Table 1). Rissato et al. developed several methods [58,59] for the analysis of multiple pesticides (organochlorine, organophosphorus, organonitrogen and pyrethroid) in potatoes, tomatoes, apples, lettuces and honey with a single cleanup step using supercritical CO₂ modified with 10% of acetonitrile. Similar works have been carried out for the analysis of multiresidues of pesticides, using SFE as a cleanup step, in cereals [60], fish muscle [61], vegetable canned soups [57], vegetables [56] or infant and diet foods [62]. A common characteristic of these works is the extremely high selectivity of SFE in the isolation of the low polarity pesticides; this fact makes SFE probably the technique of choice to isolate pesticides from low fat food. As mentioned in the introduction, to correctly assess the concentration of an analyte in a food sample, a quantitative recovery should be obtained that will mostly depend on the recovery of the analytes and not on the extraction itself. To improve the recovery of the pollutants, a common strategy is the use of solid traps. These traps consist on a solid phase compatible with the analyte and are flushed away with a compatible solvent [34]. The most common is C₁₈ [62] trap, but Rissato et al. used florisyl cartridges [58,59,116] to trap pesticides. The trapping step is very important in SFE method development not only because its effect in the quantitative recovery of the analytes but also because an extra selectivity can easily be introduced, especially in the case of solid-phase trapping, avoiding the use of further post-extraction clean up [117].

Jerry King et al. developed a method to derivatize carbamate pesticides in supercritical CO₂ media [9]. In this work,

authors dissolve derivatizing agents in CO₂ that acted as modifiers. The derivatized carbamate pesticides were then analyzed by gas chromatography–electron capture detector (GC–ECD) or gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) with excellent sensitivity. Extraction and conversion of the carbamates was complete, as indicated by HPLC with post-column hydrolysis and *o*-phthalaldehyde derivatization followed by fluorescence detection. GC–MS (ion trap) was also used to confirm the formation of the carbamate derivatives. Compared with the same HFBA (heptafluorobutyric acid) reaction in an organic solvent, the derivatization reaction time was considerably shorter in SC-CO₂. The described approach, combining both extraction and derivatization, simplifies the analysis of carbamate pesticides and eliminates the use of organic solvents associated with the derivatization step. The combination of extraction–reaction prior to analysis is not something new, Turner et al. [118] reviewed the state of the art of enzyme reactions in supercritical media to form useful analytical derivatives for gas chromatography, liquid chromatography, or SF chromatographic analysis.

Another strategy to improve the isolation of pesticides is the use of supercritical fluid mixtures [119]. Excellent recoveries were obtained for incurred organochlorine and -phosphorus pesticides from a variety of food products at ppb levels using either CO₂/N₂ or CO₂/HC-134 mixtures. Results from these and additional experiments suggest that binary fluid mixtures can significantly reduce the need for additional sample cleanup prior to chromatographic analysis.

Besides pesticides, veterinary drugs are widely spread in the primary sector, but none of them should reach the consumers or, at least, should not reach them over the maximum allowed limits. Matabudul et al. [63] developed a rapid method for the determination of lasalocid in poultry feed using SFE and HPLC; lasalocid is widely used as a coccidiocidal drug in poultry to increase feed efficiency and for weight gain in ruminants. The actual lasalocid analysis method [120] involves several steps that were reduced to a single one by using SFE. Only 20 ml of low toxicity solvent mixture (ethanol/ethyl acetate/NaOH) are required for the complete extraction and determination of lasalocid; thus, the new SFE method is fast, economic and represents little hazards from exposure to solvents.

But only non-polar drugs are not susceptible to be isolated using SFE. One example is the extraction of sulphonamides, which are commonly used in subtherapeutic doses in drinking water but also as bacteriostatic in chicken, beef and pig grown. Arancibia et al. [14] enhanced the isolation of sulphonamides by using SFE at high temperatures (between 120 and 160 °C), in only 33 min of extraction (30 static + 3 dynamic), and avoiding the use of further cleanup steps prior to HPLC injection. In this case, authors mix the sample with celite in order to absorb the moisture. Due to the polar nature of sulphonamides its necessary to use a modifier, in this case, Arancibia et al. optimized the analytical procedure to use only 3 ml of methanol per gram of raw meat.

Supercritical carbon dioxide extraction can advantageously be used to extract non-polar pollutants, such as polyaromatic hydrocarbons (PAH), from foods [64,65]. Different extraction and cleanup methods have been used, but the extracting condi-

tions turned to be very similar (around 300 bar and 100 °C) to optimize the PAH extraction. Lage Yusty et al. [64] used octadecylsilane (ODS) beads in the SFE extraction cell to adsorb lipids from the sample (fish muscle) while extracting the PAH. This significantly reduced lipid interference in subsequent GC–MS analyses. On the other hand, Yeakub and Cole [65] used a different strategy for the analysis of PAH in vegetable oils, consisting in the extraction of the raw material by SFE (without previous cleanup step) and the use of HPLC coupled to fluorescence detection to avoid lipid interferences.

Other environmental pollutants that can be found in food samples, and therefore should be quantified and controlled, are halogenated dioxins and biphenyls (PCBs) [66,117,121]. In this field, SFE has proved its effectiveness as sample preparation method previous to GC–MS. The isolation of this kind of compounds is relatively easy using SC-CO₂ due to their low polarity. A reasonable approach would be to combine moderate SFE conditions (reducing coextracted lipids) with florisil present in the extraction thimble as fat retainer. The extracted PCBs should then be trapped on a solid phase packed with florisil and eluted with *n*-heptane. Additionally, it might be possible to determine also the fat content in the same extract by using methanol as modifier after the PCB extraction step, breaking the interactions between the lipids and the fat retainer, as recently demonstrated for a model fat sample [122].

In many countries, the legislation limits or bans the use of ionizing radiations of foodstuff, therefore, the detection of radiolytic products must be improved. Among these products, alkylcyclobutanones are formed in very low doses and, as a consequence, it is necessary to develop efficient extraction methods. In this sense, Gadgil et al. [67], developed a method to assess the content of alkylcyclobutanones in 20 min working at 375 bar and 75 °C, even in high fat content samples. In this case the strategy to avoid interferences with fat is to load the sample with sand and florisil in order to trap the fat, after the extraction, cyclobutanones were retained in glass wool.

Other important area of application of SFE has been in the assessment of food frauds. Karásek et al. developed a study for wine variety certification [54]; in this work they compared a direct countercurrent SFE with a two step SPE–SFE and found that the direct SFE resulted in a more specific and representative gas chromatographic fingerprint of the wine sample.

SFE has been also used to identify adulteration of black pepper powder with ground papaya seed [68] combining SFE with thin layer chromatography (TLC) allowing the detection of 20 g of papaya seed per kg of mixture. Adulteration can be detected on the basis of the presence of a fluorescent band in TLC at *R*_f 0.172 at 366 nm in an SFE extract of the sample. Bhattacharjee et al. [68] studied model blends of papaya and pepper analyzing marker compounds present only in papaya: 3-Eicosene was selected as marker of adulteration since it was only found in papaya seed extracts.

2.2.2. PLE applications

As mentioned, analysis of pesticides is an important issue in food safety. Due to the characteristics of PLE, this technique has been successfully applied to the extraction of several pesti-

cides simultaneously; this is an important advantage over other sample preparation methods since frequently different kind of pesticides are employed at the same time. In fact, the applicability of PLE as a routine technique for the extraction of pesticides in vegetables has been demonstrated [123]. In that work [123] a PLE method, using a commercially available instrument, was developed to extract simultaneously 100 pesticides of different polarity from food commodities using a mixture of ethyl acetate and acetone (3:1, v/v) as extraction solvent. The whole extraction procedure, consisting on two static cycles, took only 15 min. By comparing the PLE extraction of these pesticides with other traditional extraction methods (such as solvent shake extraction), it can be easily seen that PLE is less time and solvent consuming while providing at the same time acceptable values of recoveries, precision, quantification limits and selectivity, corroborating the effectiveness of PLE for routine pesticide analysis. This technique has also been evaluated for the extraction of 25 pesticides from rape seed [124]. Although in this particular case, the application of PLE implied the necessity for a lipid removal cleanup procedure, authors considered PLE as a good alternative to the conventional liquid–liquid extraction procedure. Different fruits have also been studied to determine their content in pesticides. The studies employed PLE (with commercial instruments) combined with diverse analytical techniques [125,126]. Adou et al. [125] determined the presence of different pesticides in several fruit samples with appropriate recoveries while minimizing environmental concerns and time. To carry out this study [125], they introduced the homogenized sample inside the extraction cell between sand layers in a sandwich-like format. This strategy has been extensively employed to obtain a better dispersion of the sample while keeping it into the extraction cell. Using acetone/dichloromethane (3:1, v/v) as extraction solvent at 110 °C and 1500 psi, using two static extraction cycles, it was possible to extract 24 pesticides and to determine them by GC with different detectors [125]. Similarly, PLE has been employed to extract trace pesticides from oranges and peaches [126]. In that work [126], the extraction conditions were optimized for different pesticides and the best recoveries were achieved at 75 °C and 1500 psi as extraction conditions using ethyl acetate as solvent. Higher temperatures led to the co-extraction of other organic compounds present in fruits such as carotenoids and flavonoids. The extraction time was set at 7 min, which was considered sufficient due to the high solubility of the target compounds in ethyl acetate. Using these extraction conditions, the authors found that the efficiency of PLE to extract pesticides from fruit was comparable with that obtained using traditional extraction techniques, while using smaller solvent volumes and significantly less time. Limits of quantification (LOQ) below European legislation requirements were achieved.

As mentioned, it is mandatory to assess the presence of veterinary drugs residues in foods due to their negative effects on human health. Thirteen sulfonamides could be detected in raw meat and infant foods using PLE [127]. To extract these compounds, water at 160 °C was used for 15 min of extraction time (including 5 min of static extraction time). To get proper extracts, homogenized meat was mixed with C₁₈ par-

ticles, and the extraction cell was filled then with diatomaceous earth. Direct analysis of the extracts was possible using this strategy.

PAHs have also been extracted from smoked food using a commercial ASE instrument [128]. The extraction conditions consisted of 100 °C and 1500 psi with hexane, and using two static cycles of 10 min each. The homogenized sample was placed at the bottom and the extraction cell was filled with sand. Although a cleanup procedure was needed after the extraction, the results showed similar or better recoveries for different PAHs than using Soxhlet extraction. Besides, only 20–30 ml of solvent were employed for a total extraction time of 15–20 min. Interestingly, up to 12 different PAHs were found in different smoked meat products. Similar conclusions were reached by Morales-Muñoz et al. [129].

Several extraction and cleanup methods have been developed using PLE to analyze PCBs in food and food-related materials [130]. The use of sorbents in the PLE extraction cell has been studied by Gómez-Ariza et al. [131]; using mild extraction conditions (40 °C for 10 min and two static cycles) and a dichloromethane/pentane (15:85, v/v) mixture as extraction solvent, the sorbents allowed the extraction of PCBs from natural materials retaining the co-extracted lipids from the matrix and enabling for a direct analysis of the extract collected in a single-step procedure. In a previous work, Björklund et al. [132] demonstrated the possibility of obtaining fat-free extracts from naturally contaminated fish meal using sulphuric acid-impregnated silica as fat retainer. In this way, an on-line cleanup of fat-containing matrixes was possible prior to their analysis to determine the PCBs content. A similar procedure was used to obtain fat-free extracts ready for PCBs analysis from several food and feed matrices [133]. In these applications, the dispersion of the sample into the extraction cell proved to be critical. To obtain appropriate extracts, a layer of fat retainer was placed above two filter papers in the bottom of the extraction cell. Then, other filter paper was introduced with the sample dispersed and with sodium sulphate above it. The rest of the extraction cell volume was filled with sodium sulphate placing two more filter papers on top. Similar packing was employed to achieve an integrated extraction, clean up and fractionation of the different analytes to proceed with the determination of dioxins in foods [134]. In this case, the fat retainer was replaced by a carbon/celite mixture.

Several works concerning the optimization of the extraction of toxins in contaminated foods have been published [135–140]. Specifically, zearalenone is a mycotoxin produced by the fungi of the *Fusarium* species that can be found in cereals and that has potential negative effects on humans. An experimental design was used to optimize the extraction of this compound from cereals [141]. The parameters optimized were temperature, time and type of extraction solvent. The selected values (80 °C, 5 min and methanol/acetonitrile (1:1, v/v), respectively) allowed the recovery of zearalenone from wheat and corn with results comparable with those obtained with the conventional extraction techniques. Slightly different extraction conditions were obtained by Urraca et al. [140] being, after optimization, equal to 50 °C, 5 min, using methanol/acetonitrile (1:1, v/v) as extraction solvent.

3. Conclusions and future outlooks

Today, there is a real need for new methods for preparation of samples that can help to determine an increasing number of compounds (with biological activity or with high toxicity) with low solvent consumption in a fast, reproducible and automatic way. Even if an increase in the sensitivity, reliability and speed of analysis has been fulfilled with new and costly laboratory instruments, there is a lack of standard methods for sample preparation that are able to provide good recoveries of the target compounds in a short time, with very low or no consumption of organic solvents. Sample preparation methods based on the use of compressed fluids, such as SFE and PLE, can meet these requirements providing fast, reliable, clean and cheap methods that can be used for routine analysis. On the other hand, there is a clear need of validation of these new techniques and procedures towards their evolvement as official methods (e.g., AOAC protocols) substituting the most laborious, time consuming and classical procedures.

Even though SFE and PLE share some good features, there are few variations regarding applicability to different types of samples and target-molecules: for example, SFE and PLE are used to extract solid samples although liquid samples can also be processed in SFE using, for example, a countercurrent column. Another difference between both techniques is the target analyte: although both can be used to extract all types of compounds (as seen in the revision), SFE is preferentially employed to extract non-polar compounds while PLE can be used with all the conventional solvents thus increasing its range of applicability from polar to non-polar compounds. Special mention should be done for SWE in which polar and medium-polarity compounds can be extracted in a clean way. Thermal stability of the compounds is mandatory to use PLE although it is important to consider that oxygen is not present during the extraction; therefore if a compound can suffer decomposition due to the presence of oxygen at high temperature, this effect can be minimized in PLE. Of course, SFE has been long suggested as the method of choice for thermolabile compounds extraction.

By comparing the performance of SFE and PLE it can be seen that, in general, SFE is more selective allowing to obtain extracts that can be directly analyzed without additional cleanup steps. On the other hand, PLE is more matrix-independent and has the great advantage of being the easy replacement of old methods based on Soxhlet extraction.

On the other hand, method development is more difficult in SFE since more parameters have to be optimized. It has also the disadvantage of the manual operation (compared with PLE that is completely automatic) but it offers the possibility of direct coupling to different separation techniques (mainly chromatographic) which, in turn, decrease the manual labor. Although there are not many studies related to the direct coupling of PLE to chromatographic techniques, efforts have been made to couple this technique (using different solvents and water) to GC and LC; readers are referred to an excellent revision by Hyötyläinen [27].

In the future, miniaturized analytical procedures, based on chip technology, coupled with sophisticated detection systems

and bioinformatics, could provide high sample throughputs minimizing sample and solvents consumptions.

As for the sample preparation methods discussed in the present work, the discovery of more selective compressed fluids and the development of new strategies based on the employment of highly selective ligands will greatly improve the extraction and quantification of target compounds to meet the actual requirements of regulatory agencies and control laboratories.

Acknowledgements

This work has been financed by Spanish Ministry of Education (Project AGL2005-06726-C04-01/02 and Project AGL2005-05320-C02-01) and Comunidad Autónoma de Madrid (S-0505/AGR/000153) projects. J.A.M. and M.H. thank the Spanish Ministry of Education for a FPI grant.

References

- [1] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *Food Chem.* 98 (2006) 136.
- [2] Q. Lang, C.M. Wai, *Talanta* 53 (2001) 771.
- [3] L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3.
- [4] A. Robles Medina, E. Molina Grima, A. Giménez Giménez, M.J. Ibáñez González, *Biotechnol. Adv.* 16 (1998) 517.
- [5] N.L. Rozzi, R.K. Singh, *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 1 (2002) 33.
- [6] M. Zougagh, M. Valcárcel, A. Rios, *TRAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 399.
- [7] S.P. Lu, Q. Sun, J.H. Wang, B.Q. Sun, *Zhongguo Zhong yao za zhi* 31 (2006) 357.
- [8] M. Valcárcel, M.T. Tena, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 561.
- [9] J.W. King, Z. Zhouyao, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 88.
- [10] P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, *Encyclopedia of analytical science*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004.
- [11] G. Perretti, O. Marconi, L. Montanari, P. Fantozzi, *Food Sci. Technol.* 37 (2004) 87.
- [12] Irvan, U. Hasanudin, M. Faisal, H. Daimon, K. Fujie, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69 (2006) 506.
- [13] S. Santoyo, S. Caverio, L. Jaime, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, G. Reglero, *J. Food Prot.* 69 (2006) 369.
- [14] V. Arancibia, M. Valderrama, P. Rodríguez, F. Hurtado, R. Segura, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1710.
- [15] C. Simó, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, C. Barbas, G. Reglero, A. Cifuentes, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6648.
- [16] J. Tabera, A. Guinda, A. Ruiz-Rodríguez, F.J. Señoráns, E. Ibáñez, T. Albi, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4774.
- [17] M.D. Burford, K.D. Bartle, S.B. Hawthorne, *Adv. Chromatogr.* 37 (1997) 163.
- [18] M. Saito, Y. Yamauchi, T. Okuyama, *Fractionation by Packed-Column SFC and SFE: Principles and Applications*, VCH, New York, 1994.
- [19] C. Deng, N. Li, X. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 237.
- [20] M. Herrero, P.J. Martín-Alvarez, E. Ibáñez, J. Señoráns, A. Cifuentes, *Food Chem.* 93 (2005) 417.
- [21] E.S. Ong, J.S.H. Cheong, D. Goh, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 92.
- [22] L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 275.
- [23] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1033.
- [24] B. Van Bavel, K. Hartonen, C. Rappe, M.L. Riekkola, *Analyst* 124 (1999) 1351.
- [25] H.J. Vandenburg, A.A. Clifford, K.D. Bartle, S.A. Zhu, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1943.
- [26] D.J. Miller, S.B. Hawthorne, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1618.

- [27] C. Turner, *Modern Extraction Techniques: Overview of Modern Extraction Techniques for Food and Agricultural Samples*, ACS Symposium Series, Oxford University Press, Portland, OR, 2006.
- [28] S.B. Hawthorne, Y. Yang, D.J. Miller, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2912.
- [29] D.J. Miller, S.B. Hawthorne, *J. Chem. Eng. Data* 45 (2000) 315.
- [30] J.A. Mendiola, F.R. Marín, S.F. Hernández, B.O. Arredondo, F.J. Señoráns, E. Ibáñez, G. Reglero, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1031.
- [31] O. Montero, M.D. Macías-Sánchez, C.M. Lama, L.M. Lubián, C. Mantell, M. Rodríguez, E.M. De La Ossa, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9701.
- [32] M. Sun, F. Temelli, *J. Supercrit. Fluids* 37 (2006) 397.
- [33] G. Vasapollo, L. Longo, L. Rescio, L. Ciurlia, *J. Supercrit. Fluids* 29 (2004) 87.
- [34] M. López, L. Arce, J. Garrido, A. Ríos, M. Valcárcel, *Talanta* 64 (2004) 726.
- [35] N. Vedaraman, C. Srinivasakannan, G. Brunner, B.V. Ramabrahmam, P.G. Rao, *J. Supercrit. Fluids* 34 (2005) 27.
- [36] A.M. Hurtado-Benavides, F.J. Señoráns, E. Ibáñez, G. Reglero, *J. Supercrit. Fluids* 28 (2004) 29.
- [37] T.F. Ko, Y.M. Weng, R.Y.Y. Chiou, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5343.
- [38] C. Saengcharoenrat, D.E. Guyer, *J. Food Eng.* 63 (2004) 33.
- [39] S. Zhao, H. Liang, *Pol. J. Chem.* 80 (2006) 99.
- [40] E.M.Z. Michielin, L.F.V. Bresciani, L. Danielski, R.A. Yunes, S.R.S. Ferreira, *J. Supercrit. Fluids* 33 (2005) 131.
- [41] A. Smelcerovic, Z. Lepojevic, S. Djordjevic, *Chem. Eng. Tech.* 27 (2004) 1327.
- [42] M. Ashraf-Khorassani, M. Ude, T. Doane-Weideman, J. Tomczak, L.T. Taylor, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1822.
- [43] A.B.A. De Azevedo, U. Kopcak, R.S. Mohamed, *J. Supercrit. Fluids* 27 (2003) 223.
- [44] N. Yilmaz, H. Sari, A. Demirbasí, *Energy Sources* 24 (2002) 375.
- [45] A. Chafer, M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, A. Berna, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2050.
- [46] W.Y. Teng, C.C. Chen, R.S. Chung, *Phytochem. Anal.* 16 (2005) 459.
- [47] L.H. Chang, T.T. Jong, H.S. Huang, Y.F. Nien, C.M.J. Chang, *Sep. Purif. Technol.* 47 (2006) 119.
- [48] B. Klejdus, L. Lojkova, O. Lapcik, R. Koblovská, J. Moravcova, V. Kuban, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1334.
- [49] S. Santoyo, S. Cervero, L. Jaime, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, G. Reglero, *J. Food Prot.* 68 (2005) 790.
- [50] S. Santoyo, R. Lloria, L. Jaime, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, G. Reglero, *Eur. Food Res. Tech.* 222 (2006) 565.
- [51] S.M. Pourmortazavi, M. Ghadiri, S.S. Hajimirsadeghi, *J. Food Comp. Anal.* 18 (2005) 439.
- [52] C. Seger, H. Rompp, S. Sturm, E. Haslinger, P.C. Schmidt, F. Hadacek, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 453.
- [53] J. Peng, G. Fan, Y. Wu, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 52.
- [54] P. Karasek, J. Planeta, E.V. Ostra, M. Mikesova, J. Golias, M. Roth, J. Vejrosta, *J. Chromatogr. A* 1002 (2003) 13.
- [55] M. Bartlová, L. Opletal, V. Chobot, H. Sovová, *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 283.
- [56] S.J. Lehotay, A. Schaner, S. Nemoto, J. Harman-Fetcho, J. Barney, L. Heighton, R. McIntyre, L. Rosenblum, A. Lightfield, T. Barden, M. Hopper, G.A. Valverde, A.T. Pihlstrom, G. Blomkvist, M. Anastasiades, E. Scherbaum, J. Santer, R. Deets, S. Morrison, R. Harvey, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1148.
- [57] A. Aguilera, M. Brotons, M. Rodríguez, A. Valverde, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5616.
- [58] S.R. Rissato, M.S. Galhiane, A.G. De Souza, B.M. Apon, *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 1038.
- [59] S.R. Rissato, M.S. Galhiane, F.R.N. Knoll, B.M. Apon, *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 153.
- [60] J. Poustka, K. Holadova, J. Hajsova, *Eur. Food Res. Tech.* 216 (2003) 68.
- [61] P. Antunes, O. Gil, M.G. Bernardo-Gil, *J. Supercrit. Fluids* 25 (2003) 135.
- [62] J.C. Chuang, K. Hart, J.S. Chang, L.E. Boman, J.M. Van Emon, A.W. Reed, *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 87.
- [63] D.K. Matabudul, N.T. Crosby, I. Lumley, S. Sumara, *Food Chem.* 75 (2001) 465.
- [64] M.A. Lage Yusty, J.L. Cortizo Davina, *Food Control* 16 (2005) 59.
- [65] A. Yeakub, R.B. Cole, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 923.
- [66] G. Boatto, M. Nieddu, A. Carta, G. Chessa, M.V. Faedda, R. Cerri, *Fresenius Environ. Bull.* 12 (2003) 435.
- [67] P. Gadgil, J.S. Smith, K.A. Hachmeister, D.H. Kropf, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1890.
- [68] P. Bhattacharjee, R.S. Singhal, A.S. Gholap, *J. Sci. Food. Agric.* 83 (2003) 783.
- [69] R. Rodil, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R.C. Torrijos, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2259.
- [70] J.A. Mendiola, L. Jaime, S. Santoyo, G. Reglero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, *Food Chem.* 102 (2007) 1357.
- [71] J.A. Mendiola, C. Torres, A. Tore, P.J. Martín-Alvarez, S. Santoyo, B. Arredondo, F.J. Señoráns, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *Eur. Food Res. Technol.* 224 (2007) 505.
- [72] L. Vázquez, C. Torres, T. Fornari, N. Grigelmo, F.J. Señoráns, G. Reglero, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108 (2006) 659.
- [73] L. Vázquez, C. Torres, T. Fornari, F.J. Señoráns, G. Reglero, *J. Supercrit. Fluids* 40 (2006) 59.
- [74] E.E. Stashenko, B.E. Jaramillo, J.R. Martínez, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 105.
- [75] Y. Hae Choi, J. Kim, K.P. Yoo, *Chromatographia* 57 (2003) 73.
- [76] N. Vedaraman, G. Brunner, C. Srinivasa Kannan, C. Muralidharan, P.G. Rao, K.V. Raghavan, *J. Supercrit. Fluids* 32 (2004) 231.
- [77] M. Herrero, L. Jaime, P.J. Martín-Alvarez, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5597.
- [78] M.M. Sanagi, H.H. See, W.A.W. Ibrahim, A.A. Naim, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 71.
- [79] M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 249.
- [80] G. Sivakumar, L. Bacchetta, *Chem. Nat. Comp.* 41 (2005) 654.
- [81] D.E. Breithaupt, *Food Chem.* 86 (2004) 449.
- [82] J.R. Denery, K. Dragull, C.S. Tang, Q.X. Li, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 175.
- [83] C. Deng, A. Wang, S. Shen, D. Fu, J. Chen, X. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 326.
- [84] F. Gogus, M.Z. Ozel, A.C. Lewis, *Flavour Fragr. J.* 21 (2006) 122.
- [85] M.Z. Ozel, F. Gogus, A.C. Lewis, *Food Chem.* 82 (2003) 381.
- [86] M.Z. Ozel, H. Kaymaz, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1127.
- [87] M.Z. Ozel, F. Gogus, J.F. Hamilton, A.C. Lewis, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 115.
- [88] N.T. Dunford, M. Zhang, *Food Res. Int.* 36 (2003) 905.
- [89] T.G. Toschi, A. Bendini, A. Ricci, G. Lercker, *Food Chem.* 83 (2003) 551.
- [90] J. Zhao, S.P. Li, F.Q. Yang, P. Li, Y.T. Wang, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 188.
- [91] Z.Y. Ju, L.R. Howard, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 52207.
- [92] Z. Piñero, M. Palma, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 19.
- [93] M. Palma, Z. Piñero, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 1.
- [94] M. García-Marino, J.C. Rivas-Gonzalo, E. Ibáñez, C. García-Moreno, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 44.
- [95] M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 169.
- [96] B. Klejdus, R. Mikelova, V. Adam, J. Zehnálek, J. Vacek, R. Kizek, V. Kubán, *Anal. Chim. Acta* 517 (2004) 1.
- [97] D.L. Luthria, S. Mukhopadhyay, A.L. Kwansa, *J. Sci. Food. Agric.* 86 (2006) 1350.
- [98] S. Mukhopadhyay, D.L. Luthria, R.J. Robbins, *J. Sci. Food. Agric.* 86 (2006) 156.
- [99] M. Papagiannopoulos, A. Mellethin, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 345.
- [100] M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellethin, M. Krappe, G. Maio, R. Galens, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 9.
- [101] A.L. Dawidowicz, D. Wianowska, B. Baraniak, *LWT* 39 (2006) 308.
- [102] M. Ollanketo, A. Peltoketo, K. Hartonen, R. Hiltunen, M.L. Riekkola, *Eur. Food Res. Technol.* 2002 (2002) 158.
- [103] F.Q. Yang, S.P. Li, Y. Chen, S.C. Lao, Y.T. Wang, T.T.X. Dong, K.W.K. Tsim, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 552.
- [104] M. Herrero, D. Arráez-Román, A. Segura, E. Kenndler, B. Gius, M.A. Raggi, E. Ibáñez, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 54.

- [105] Y.X. Gong, S.P. Li, Y.T. Wang, P. Li, F.Q. Yang, *Electrophoresis* 26 (2005) 1778.
- [106] A. Shotipruk, J. Kiatsonserm, P. Pavasant, M. Goto, M. Sasaki, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1872.
- [107] C. Deng, J. Ji, X. Wang, X. Zhang, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1237.
- [108] V. Flores, J. Saffi, M.I.S. Melecchi, F.C. Abad, M.M. Martínez, E.C. Oliveira, R. Assis Jacques, E.B. Caramao, *J. Chromatogr. A* 1105 (2006) 148.
- [109] Y. Jiang, S.P. Li, H.T. Chang, Y.T. Wang, P.F. Tu, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 268.
- [110] E.S. Ong, S.M. Len, *Anal. Chim. Acta* 482 (2003) 81.
- [111] G.F. Barbero, M. Palma, C.G. Barroso, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 3231.
- [112] A.L. Dawidowicz, D. Wianowska, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 1155.
- [113] M. Herrero, C. Simó, E. Ibáñez, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 26 (2005) 4215.
- [114] E. Ibáñez, A. Kubátová, F.J. Señoráns, S. Caverio, G. Reglero, S.B. Hawthorne, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 375.
- [115] I. Rodríguez-Meizoso, F.R. Marin, M. Herrero, F.J. Señoráns, G. Reglero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1560.
- [116] S.R. Rissato, M.S. Galhiane, M. Gerenutti, *Informacion Tecnologica* 16 (2005) 21.
- [117] E. Björklund, C. Holst, E. Anklam, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 39.
- [118] C. Turner, J.W. King, T. McKeon, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 797.
- [119] J.W. King, M.L. Hopper, J.M. Snyder, *Sep. Sci. Technol.* 41 (2006) 861.
- [120] Analytical Methods Committee, *Analyst* 120 (1995) 2175.
- [121] E.C. Anyanwu, M.H. El-Saeid, A.I. Akpan, M.A. Saled, *Sci. World J.* 3 (2003) 913.
- [122] E. Björklund, M. Jaremo, L. Mathiasson, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 23 (2000) 2337.
- [123] A. Garrido Frenich, I. Martínez-Salvador, J.L. Martínez-Vidal, T. López-López, *Anal. Bioanal. Chem.* 33 (2005) 1106.
- [124] T. Pihlstrom, G. Isaac, M. Waldeback, B.G. Osterdahl, K.E. Markides, *Analyst* 127 (2002) 554.
- [125] K. Adou, W.R. Bontoyan, P.J. Sweeney, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4153.
- [126] C. Blasco, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 37.
- [127] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, M. Sergi, C. Olmi, R. Curini, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4614.
- [128] G. Wang, A.S. Lee, M. Lewis, B. Kamath, R.K. Archer, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1062.
- [129] S. Morales-Muñoz, J.L. Luque García, M.D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 49.
- [130] B. Gomara, M.A. Fernández, M.J. González, L. Ramos, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 123.
- [131] J.L. Gómez-Ariza, M. Bujalance, I. Giráldez, A. Velasco, E. Morales, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 209.
- [132] E. Björklund, A. Muller, C. Holst, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4050.
- [133] S. Spörting, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 155.
- [134] M. Nordin, S. Spörting, K. Wiberg, E. Björklund, P. Haglund, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1472.
- [135] R. Aranda-Rodríguez, A. Tillmanns, F.M. Benoit, F.R. Pick, J. Harvie, L. Solenaia, *Environm. Toxicol.* 20 (2005) 390.
- [136] L. González, J.M. Soriano, J.C. Molto, J. Mañes, *Int. J. Food Microbiol.* 107 (2006) 223.
- [137] L. Pallaroni, C. von Holst, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 908.
- [138] D. Royer, H.U. Humpf, P.A. Guy, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 678.
- [139] J.L. Urraca, M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 175.
- [140] J.L. Urraca, E. Benito-Pena, C. Pérez-Conde, M.C. Moreno-Bondi, J.J. Pestka, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3338.
- [141] L. Pallaroni, C. von Holst, *J. Chromatogr. A* 993 (2003) 39.

β -Carotene Isomer Composition of Sub- and Supercritical Carbon Dioxide Extracts. Antioxidant Activity Measurement

LAURA JAIME,[†] JOSÉ A. MENDIOLA,[‡] ELENA IBÁÑEZ,[‡]
PEDRO J. MARTÍN-ÁLVAREZ,[‡] ALEJANDRO CIFUENTES,[‡]
GUILLERMO REGLERO,[†] AND FRANCISCO J. SEÑORÁNS^{*,†}

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid,
Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, and Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC,
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

In the present work sub- and supercritical extraction conditions using carbon dioxide were studied in order to obtain extracts with different compositions from the green microalgae *Dunaliella salina*. Different compositions of β -carotene isomers were identified in the extracts by using HPLC-DAD. Also, antioxidant activity of the extracts was measured using a TEAC assay. An experimental design was applied considering two factors, extraction pressure and temperature, in a wide range of values, trying to maximize the extraction yield. Higher yields were obtained at high pressures and low temperatures, that is, at higher CO₂ densities. Attempts were made to correlate the antioxidant activity of the extracts with their chemical composition by means of principal component analysis. A certain relationship was found between their antioxidant activity and the isomeric composition of β -carotenes. As a result, an original equation is proposed to predict the antioxidant activity of extracts from *D. salina* in terms of the ratio 9-*cis*- β -carotene/all-*trans*- β -carotene, the concentration of α -carotene, and, especially, the concentration of 9-*cis*- β -carotene.

KEYWORDS: *Dunaliella salina*; TEAC; ABTS; HPLC; antioxidant; β -carotene isomers; microalgae; supercritical

INTRODUCTION

Nowadays, there is an increasing interest in the use of antioxidants in foods since they markedly delay or prevent lipid oxidation (1, 2) and, more interestingly, they have been demonstrated to have important beneficial effects on health (3). In this sense, there seems to be a relationship between the reactive oxygen species (ROS) and pathogenesis of many diseases and aging (4). Antioxidants appear to act against these negative effects by raising the levels of endogenous defense [e.g., by upregulating the expression of genes encoding the enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidase] (5, 6).

The potential use of antioxidants as food ingredients in the so-called functional foods requires several steps such as the extraction or purification from a natural source (in order to obtain "natural ingredients" rather than synthetic ones), preferably using environmentally clean processes, the evaluation of their potential *in vitro* activity, the chemical characterization

of the extracts, and the statement of the properties of the functional food by *in vivo* assays.

Edible microalgae have long been considered a good source of energy and nutritional compounds, but lately there has been an increasing interest in their use as a potential source of compounds with biological properties (mainly antioxidants). Among these, carotenoids have widely been studied (7, 8), showing through epidemiological evidence that β -carotene antioxidant activity can prevent cancer of various organs such as lungs, stomach, cervix, pancreas, colon, rectum, breast, prostate, and ovary (9–12).

Dunaliella salina is a unicellular biflagellate green alga from Chlorophyceae gender. First sighted in 1838 in saltern evaporation ponds in the south of France by Michel Felix Dunal, it was named after its discoverer by Teodoresco in 1905 (13). *Dunaliella* is known to accumulate carotenoids under various stress conditions. The algal cells, lacking a rigid cell wall, instead are surrounded by a thin elastic membrane. This alga can yield three major valuable products, namely, glycerol, β -carotene, and proteins. In recent years, it is mainly cultivated for carotenoid obtention. *D. salina* under ideal conditions can yield ~400 mg of β -carotene/m² of cultivation area (9). The ability of *Dunaliella* to proliferate over practically the entire range of salinities makes its cultivation easy and economically feasible

* Corresponding author. Phone: +34 91 497 3775. Fax: +34 91 397 8255. E-mail: javier.senorans@uam.es.

[†] Universidad Autónoma de Madrid.

[‡] Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC.

(14). Massive carotenoid accumulation during its cultivation is typically induced by reducing the growth rate by deprivation of nutrients or applying high light intensities. Thus, some strains may contain up to 10% of β -carotene including a large percentage of the 9-*cis* isomer (13, 15).

As mentioned, β -carotene functional activity has been largely reported *in vivo* and *in vitro*, and specifically the 9-*cis* isomer has demonstrated a higher antioxidant activity due to the higher reactivity of the *cis* bond compared to *trans* (16). On the other hand, there is a preferential absorption of all-*trans*- β -carotene and α -carotene compared to the 9-*cis* β -isomer (17). In fact, the *in vivo* antioxidant activity of carotenoids from *D. salina* has been reported and compared to synthetic carotenes, and the results clearly demonstrated the beneficial effects of algal carotenoids (9). *Dunaliella* extracts have been tested against fibrosarcoma (18), hepatotoxicity (19, 20), diabetes mellitus, and atherosclerosis (21) or even for cosmetic uses (22, 23).

Sub- and supercritical CO₂ has properties of liquid-like density and high compressibility, which enable an easy control over its solvent power. It has high diffusivity, which reduces mass transfer limitations, and low surface tension, which allows penetration of pores smaller than those accessible by traditional liquid solvents. It allows extractions at low to moderate temperatures, leaves no solvent residues, and is environmentally acceptable (24). Besides, CO₂ provides a nonoxidizing atmosphere in extractions avoiding extracts from degradation and also provides the possibility to fractionate extracts by sequential decreases of pressure and temperature tuning its solvating power (25). Supercritical fluid extraction (SFE) is a well-known technique for obtaining carotenoid-rich extracts (26–29), but only one reference can be found related to the selective extraction of isomers of carotene (30). In this field, previous work has been done in our laboratory using pressurized solvent extraction (31).

In this work, selective extraction of *cis*–*trans* geometrical isomers of β -carotene by SFE is explored. The hypothesis is based on the different dissolution rate of 9-*cis*/all-*trans* isomers in CO₂ which, in fact, depends on the different physicochemical properties of both isomers. Indeed, all-*trans* is practically insoluble in oil and easily crystallized at low temperatures, while 9-*cis*- β -carotene is much more soluble in hydrophobic–lipophilic solvents, amorphous, and has a high melting point (32). These properties suggest a higher solubility of 9-*cis* isomer in pressurized CO₂ at certain conditions. Considering the interest of the selective enrichment in a given carotene isomer and its associated antioxidant activity, it is remarkable that no studies have been performed so far on the effect of different sub- or supercritical extraction conditions.

Therefore, the goal of the present investigation was to study the effect of a wide range of sub- and supercritical conditions on the extraction of antioxidants from *D. salina* and, specifically, on the selective extraction of different β -carotene isomers. The extracts were analyzed to determine their chemical composition, and statistical correlations were studied to establish a mathematical model able to predict the antioxidant activity of the extracts based on their isomeric composition.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Samples and Reagents. Microalgae samples (*D. salina*) consisted of freeze-dried microalgae from NBT Ltd. (Jerusalem, Israel) that were stored under dry and dark conditions packed in the absence of oxygen until utilization.

ABTS [2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] and potassium persulfate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and the carotene isomer mixture was from

Table 1. Factor Levels (Coded and Real Values) of the Experimental Matrix Design for SFE of *D. salina* and Results Obtained for Yield (% Dry Weight/Initial Weight) and Antioxidant Activity (AA) Measured Using TEAC Assay, along with Values of Density

expt	factor levels				CO ₂ density (g/L)	yield (%)	AA ^a
	coded values		real values				
	pressure	temp	P (atm)	T (°C)			
1	0	0	310	27.5	962.4	4.41	0.181
2	0	0	310	27.5	962.4	4.42	0.169
3	1	1	400	40	956.8	5.48	0.176
4	1	−1	400	15	1035.7	6.08	0.268
5	−1	1	220	40	858.1	4.12	0.093
6	−1	−1	220	15	969.6	4.31	0.115
7	1.414	0	437.3	27.5	1008.9	6.58	0.452
8	−1.414	0	182.7	27.5	890.9	4.02	0.157
9	0	1.414	310	45.2	896.2	4.38	0.253
10	0	−1.414	310	9.8	1024.4	4.52	0.259

^a Antioxidant activity is expressed as TEAC mmol of Trolox/g of extract.

Darmstadt (Germany). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) and all *trans*- β -carotene was from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). All solvents, HPLC quality, were obtained from Labscan (Dublin, Ireland), except ethanol (99% purity) from Panreac Quimica (Barcelona, Spain). Milli-Q water was purified using a Milli-Q system (Millipore Corp., Billerica, MA). Carbon dioxide N48 quality was from Air-Liquide España (Madrid, Spain).

Carbon Dioxide Extractions. All supercritical fluid extractions were done in a Suprex PrepMaster supercritical fluid extractor (Suprex, Pittsburgh, PA). The flow rate was controlled using a needle valve as the variable restrictor. Extracts were collected in glass vessels cooled by self CO₂ expansion. The extraction time was fixed at 100 min: first 10 min of static extraction, followed by 90 min of dynamic extraction; 1 g of microalga was used in all extractions, mean cell size 4–12 μ m (33).

Extractions were done following a Central Composite Rotatable design considering the pressure (atm) and temperature (°C) as design factors. Experimental conditions were selected in order to test a wide range of densities, but special emphasis has been put in those conditions providing maximum densities; so pressure ranged between 182.7 and 438.3 atm and temperature between 9.8 to 45.2 °C. The different combinations provided extraction densities from 0.85 to 1.03 g/mL with most of the experiments done in the liquid-subcritical region in order to avoid carotenoids from degradation (34). A total of 10 experiments [4 points of the full factorial design, 4 star points (start distance = α = 1.414), and 2 center points] were carried out in randomized run order. The response variables selected were extraction yield (yield, determined as percent dry weight/initial weight) and antioxidant activity (Antiox) determined using the TEAC test. Table 1 shows the factor levels (coded values) corresponding to the experimental matrix design and their physical values, along with the results obtained for the response variables evaluated. The quadratic model proposed for each response variable (Y_i) was

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 T + \beta_{1,1} P^2 + \beta_{2,2} T^2 + \beta_{1,2} PT + \text{error} \quad (1)$$

where β_0 is the intercept, β_1 and β_2 are the linear coefficients, $\beta_{1,1}$ and $\beta_{2,2}$ are the quadratic coefficients, $\beta_{1,2}$ is the interaction coefficient, and error is the error variable. The parameters of the model were estimated by multiple linear regression (MLR). The effect of the each term in the model and their statistical significance, for each of the response variables, were analyzed from the standardized Pareto chart. The quadratic and the interaction terms not significantly different from zero ($P > 0.10$) were excluded from the model, and the mathematical model was refitted by MLR. The goodness of fit of the model was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and the residual standard deviation (RSD) from the ANOVA table. From the new fitted model, the optimum conditions that maximize the responses were also provided by the program. Surface plots were developed using the fitted quadratic polynomial equation obtained.

Antioxidant Analysis: TEAC Assay. The antioxidant activity of supercritical extracts of *D. salina* was measured by the TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) assay, performed essentially as previously described (35) for carotenoid standards with minor modifications. Briefly, the $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radical cation was generated by reacting 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate (final concentration) after incubation at room temperature for 16 h in the dark. The $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radical solution was diluted with ethanol to an absorbance around 0.70 at 734 nm. The reaction was initiated by the addition of 10 μL of *Dunaliella* extract (dissolved in dichloromethane) to 0.990 mL of diluted $\text{ABTS}^{+\cdot}$. The reactive mixture was allowed to stand at room temperature for 20 min (until the reaction reached a steady state), and the absorbance was immediately recorded at 734 nm. Trolox was used as reference standard, and results were expressed as TEAC values (millimoles of Trolox per gram of extract); a higher value means a higher antioxidant activity. These values were obtained from at least three different concentrations of each extract tested in the assay giving a linear response. Moreover, all analyses were done in triplicate.

Chromatographic Conditions. All analyses of the supercritical extracts were done by HPLC-DAD following a previously published method (36) in an Agilent 1100 HPLC-DAD chromatograph. Chromatograms were monitored at 450 nm (4 nm bandwidth; reference wavelength at 550 nm with 50 nm bandwidth). A YMC C30 analytical column (5 μm , 250 \times 4.6 mm i.d.) was used (YMC Schermbek, Germany). Two mobile phases were employed: (A) methanol, water, triethylamine (90:10:0.1 v/v/v); (B) MTBE, methanol, water, triethylamine (90:6:4:0.1 v/v/v/v); a separation funnel were used to separate surplus water and avoid two phases. The following gradient was used (min/% A): 0/93.5; 34/0; 38/93.5; 53/93.5 (flow rate, 1 mL/min; injection volume, 20 μL). All samples were dissolved in dichloromethane (5 mg/mL). Quantification was done using a pure all-trans standard and assuming the same response factor for all carotenoids overcoming in this way the impossibility to find commercial standards of all β -carotene isomers.

Statistical Analysis. For experimental design, the STATGRAPHICS Plus v.5.1 program (Statistical Graphics Corp., Manugistics Inc., MD, 2000) was used. This program permits both the creation and the analysis of experimental designs. Other statistical methods used for data analysis were principal component analysis (from standardized variables) to examine the relationship among the analyzed variables and stepwise multiple regression analysis to study the relationship between the antioxidant activity and chemical composition of extracts. The STATISTICA program for Windows, release 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, 2005), was used for data processing.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of Extraction Conditions. Table 1 shows the results obtained for the different extracts in terms of extraction yield (percent dry weight/initial weight) and antioxidant activity (measured using the TEAC assay and expressed as millimoles of Trolox per gram of extract) under the different experimental conditions tested. A column including the CO_2 density has also been given for information. As can be seen, in general the best results in terms of extraction yield were obtained working at higher densities (experiments 4 and 7) that were achieved by increasing the pressure and decreasing the temperature. As previously demonstrated by other authors (37, 38), extraction of carotenoids can be favored using dense CO_2 at subcritical conditions. Although in the total extraction yield other compounds different from carotenoids have to be considered, it seems clear that carotenoids have an important contribution to the total amount of extracted material.

Analysis of the experimental design data provides information on the importance and the statistical significance of each term in the model for each response variable. Pressure is the most important term followed by the quadratic term of pressure and temperature. As expected, pressure and its quadratic term have a positive influence in the extraction yield while temperature

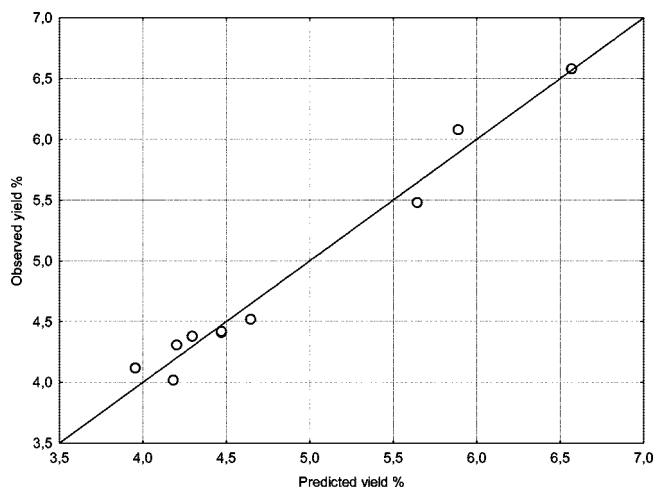


Figure 1. Plot of the observed values for yield and predicted values using eq 2 (see text for further details).

has a negative effect, increasing the response by decreasing the temperature. Once the interaction and quadratic term of temperature of the model not significantly different from zero ($P > 0.1$, 90% confidence level) were excluded from eq 1, the mathematical model was refitted by MLR giving the equation:

$$\text{yield (\%)} = 7.14462 - 0.024823P - 0.00988T + 0.000551589P^2 \quad (2)$$

where P is in atm and T in $^{\circ}\text{C}$. This equation explains 97.8% of the variation of the response variable ($R^2 = 0.978$), and the residual standard deviation (RSD) was equal to 0.161, which was expressed as a percentage of the mean value of the response ($100\text{RSD}/\bar{Y}$), and provides a relative error of the fit lower than 4%. Thus the model was found to be adequate enough to describe the data. The validity of this equation was calculated by using the leave-one-out cross-validation procedure (39, 40). As can be seen in eq 2, an increase in extraction yield is achieved by raising the pressure and lowering the temperature. Using the statistical program, the optimum extraction conditions in terms of pressure and temperature are provided, being equal to 437 atm and 9.8 $^{\circ}\text{C}$. The predicted value for the yield at the optimum conditions, using the fitted model shown in eq 2, was equal to 6.72%.

Figure 1 shows a representation of observed vs predicted values for yield. As can be seen, the agreement between the experimental values and those predicted by the model is very good with residues ranging from -0.16 to 0.19 .

Antioxidant Activity. Analysis of the data based on the antioxidant activity as response (see Table 1) did not provide any acceptable model, and only 61% of the variation of the experimental data ($R^2 = 0.61$) could be explained by considering the pressure and their quadratic term in the model (eq 1). This lack of fit can be explained by considering that the antioxidant activity will depend not only on the presence or absence of certain compounds but also on their relative proportion. Although a good mathematical model is not obtained for the antioxidant activity, a certain tendency can be observed between such activity and density, which can be correlated to the different solubility of carotenoids at different pressures (41) as mentioned above. Therefore, it seems that a more complex model has to be considered to explain the antioxidant activity of the supercritical extracts. With the objective to chemically characterize the extracts, HPLC coupled to DAD was used to analyze and identify the carotenoids present. A typical chromatogram can be seen in Figure 2. Identification of each peak was done using

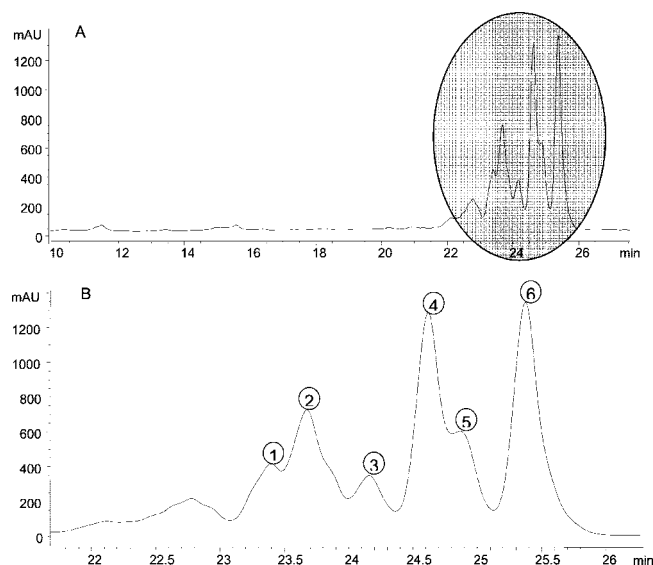


Figure 2. Chromatogram of sample 7 acquired at 450 nm (A) and zoom of the β -carotene isomer zone, 21–27 min (B). Peak identification: 1, ϵ -carotene; 2, α -carotene; 3, 13-*cis*- β -carotene; 4, all-*trans*- β -carotene; 5, 15-*cis*- β -carotene; 6, 9-*cis*- β -carotene.

the carotene mixture (α and β) and the all-*trans*- β -carotene standard; the rest of the peaks were identified comparing both UV-vis spectra and elution order based on data previously published by other authors (36, 42, 43).

The approximate carotene composition of *Dunaliella* supercritical extracts was determined using a calibration curve that was obtained by injecting all-*trans*- β -carotene standards and assuming the same response factor for all of the carotenoids. **Table 2** shows the concentration found for each compound as well as several relationships between them. As can be observed, carotenoid constitutes only a small percentage [1–7% (w/w)] of the total composition, other compounds of interest being present. Taking in account the solubilities of other components of *Dunaliella*, the rest of the extract should be composed mainly of glycerol (44, 45) and lipids (46).

In order to study possible relations between the antioxidant activity (AA) and the chemical composition of the extracts, principal component analysis was applied. Four principal components were obtained that explained 89.9% of the total variance of the data. The first principal component, which explained 60% of the total variance, correlated positively with AA (0.79), total amount of carotenoids (0.99), α -carotene (0.94), 13-*cis* isomer (0.98), all-*trans* isomer (0.97), 15-*cis* isomer (0.98), 9-*cis* isomer (0.99), concentration of other carotenoids (0.98), and the total amount of β -carotene isomers (0.99). The

second principal component, which explained 20.9% of the total variance, correlated negatively with the extraction pressure (−0.79) and density (−0.89) and positively with the ratio α -carotene/ β -carotene (0.75). On the basis of these results, it seems that there is an important correlation between the antioxidant activity and the concentration of several carotenoids, thus confirming our previous statement. Therefore, considering the loadings of the variables in the first principal component, the extracts that provide high antioxidant activities are those having high concentrations of carotenoids (total), α -carotene, and β -isomers and also high concentration of other nonidentified carotenoids. This result corroborates the fact already mentioned in the introduction about the influence of different β -carotene isomers in the final antioxidant activity and the importance of using natural sources of carotenoids as antioxidants (e.g., *D. salina* microalga) with a complex carotenoid composition.

As an attempt to obtain a model able to predict the antioxidant activity of supercritical extracts based on their chemical composition, forward stepwise MLR was used, considering as independent (predictor) variables the different carotenoid concentrations and relations shown in **Table 2**. Values of 2 and 1.9 were used for *F*-statistics to enter and remove variables, respectively. Three variables, in decreasing order of importance, were found to predict the mentioned activity, namely, 9-*cis*- β -carotene, 9-*cis*/all-*trans* ratio, and α -carotene. The estimated model was

$$\text{TEAC} = 0.332 + 0.3925[9\text{-cis-}\beta\text{-carotene}] - 0.1923[9\text{-cis}/[\text{all-trans}] - 0.3069[\alpha\text{-carotene}] \quad (3)$$

where concentrations are given in milligrams of carotenoid per 100 mg of extract. All of the coefficients are significantly different from zero ($P > 0.10$). The model provided values of 0.82 for the coefficient of determination (R^2) and 0.05 for the standard error of estimate (RSD). The predicted value of eq 3 is limited to this specific extract, because *Dunaliella* composition can change with culture conditions and so can the extracts, even if the extraction is done using the same conditions.

As can be seen in the eq 3, the concentration of 9-*cis*- β -carotene is contributing positively while concentration of α -carotene contributes negatively, that is, decreasing the TEAC value when increasing their content in the composition of the extracts. Different behavior can be deduced from the influence of the ratio 9-*cis*/all-*trans* since it contributes negatively to the equation, meaning that lower ratio 9-*cis*/all-*trans* provides higher antioxidant activity. Considering the global equation, that is, the contribution of the different factors, a synergistic behavior can be observed between 9-*cis*- and all-*trans*- β -carotene since the maximum antioxidant activity is obtained with a high

Table 2. Carotenoid Composition (Expressed as mg of Carotenoid/100 mg of Extract) of *D. salina* Supercritical Extracts Obtained at the Different Extraction Conditions Tested

expt	total carotenoids ^a	α -carotene	β -carotene				total β	other carotenoids ^b	9- <i>cis</i> /all- <i>trans</i> ratio	α/β ratio
			13- <i>cis</i>	all- <i>trans</i>	15- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>				
1	3.223	0.429	0.183	0.486	0.282	0.624	1.575	1.219	1.284	0.273
2	3.086	0.354	0.159	0.518	0.210	0.656	1.543	1.189	1.266	0.229
3	1.250	0.158	0.059	0.221	0.080	0.227	0.587	0.505	1.026	0.269
4	2.702	0.340	0.133	0.468	0.175	0.487	1.264	1.099	1.039	0.269
5	1.176	0.134	0.065	0.132	0.085	0.210	0.491	0.552	1.594	0.273
6	1.987	0.256	0.134	0.301	0.172	0.391	0.998	0.733	1.297	0.256
7	7.199	0.912	0.419	1.244	0.591	1.497	3.751	2.536	1.204	0.243
8	4.251	0.838	0.220	0.650	0.314	0.750	1.934	1.480	1.154	0.433
9	4.651	0.690	0.221	1.048	0.327	0.888	2.485	1.477	0.848	0.278
10	1.614	0.211	0.079	0.335	0.111	0.334	0.860	0.543	0.997	0.245

^a Measured as total chromatogram area. ^b Including ϵ -carotene and zeaxanthin and other nonidentified carotenoids.

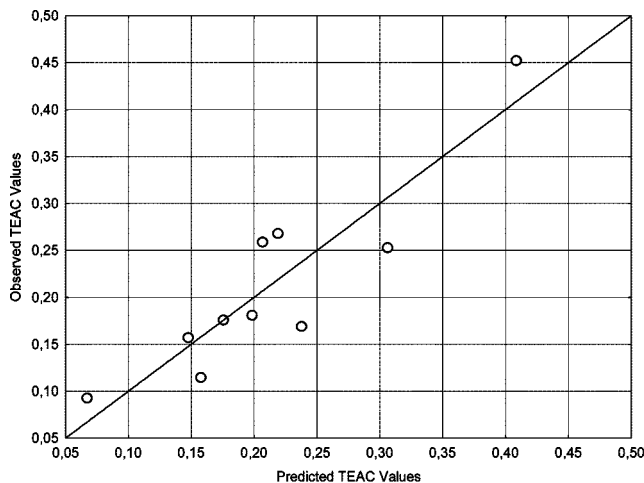


Figure 3. Plot of the observed values for antioxidant activity (TEAC) and the predicted values using the estimated equation from stepwise MLR (see text for further details).

concentration of the 9-cis isomer (up to a maximum) and a high concentration of the all-trans isomer (to minimize the second factor). It is important to emphasize the influence of the two main β -carotene isomers, 9-cis and all-trans, in the total antioxidant activity observed. Even if antioxidant activity of the pure 9-cis isomer has been found to be higher than all-trans (16), in the present work, the contribution of both isomers in a synergistic way has been demonstrated.

Figure 3 shows the observed values for TEAC and the predicted values obtained using the previous regression equation. As can be seen, the fit for the predictions of TEAC can be considered appropriate, corroborating the usefulness of our approach.

Therefore, in the present work the importance of using sub- and supercritical CO_2 to obtain extracts of *D. salina* with high antioxidant activity has been demonstrated. The strong influence of the supercritical extraction conditions in both the β -carotene isomer composition of the extracts and the antioxidant activity has also been shown. Statistical analysis of all the data, considering yield, antioxidant activity, and relative concentration of carotenoids in the different extracts suggested an important relationship among antioxidant activity and β -carotene isomeric relation, 9-cis/all-trans. The present study is posed as an optimization of the green extraction of antioxidants from *D. salina* that could be used as food ingredients.

LITERATURE CITED

- Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Loliger, J.; Aruoma, O. I. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33* (7), 601–617.
- Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Res.* **1999**, *31* (4), 261–272.
- Madhavi, D. L.; Deshpande, S. S.; Salunkhe, D. K. *Food antioxidants*; Marcel Dekker: New York, 1996.
- Cao, G.; Prior, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* **1998**, *44* (6), 1309–1315.
- Aruoma, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32* (7), 671–683.
- McCord, J. M. Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. *Food Technol.* **1994**, *48*, 106–110.
- Madhava, C.; Bhat, V. B.; Kiranmai, G.; Reddy, M. N.; Reddanna, P.; Madyastha, K. M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *277*, 599–603.
- Bhat, V. B.; Madyastha, K. M. C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275* (1), 20–25.
- Chidambara Murthy, K. N.; Vanitha, A.; Rajesha, J.; Swamy Mahadeva, M.; Sowmya, P. R.; Ravishankar, G. A. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—a green microalga. *Life Sci.* **2005**, *76* (12), 1381–1390.
- Burri, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutr. Res. (N.Y.)* **1997**, *17* (3), 547–580.
- Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58*, 100–110.
- Poppel, G. V.; Goldbohm, R. A. Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1393–1402.
- Oren, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems (Open Access)* **2005**, *1* (2), 114; doi:10.1186/1746-1448-1-2.
- Dufosse, L.; Galaup, P.; Yaron, A.; Arad, S. M.; Blanc, P.; Chidambara Murthy, K. N.; Ravishankar, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16* (9), 389–406.
- Borowitzka, M. A. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In *Chemicals from microalgae*; Cohen, Z., Ed.; Taylor & Francis: London, U.K., 1999; pp 313–352.
- Levin, G.; Mokady, S. Antioxidant activity of 9-cis compared to all-trans β -carotene in vitro. *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *17* (1), 77–82.
- Stahl, W.; Schwarz, W.; Sies, H. Human serum concentrations of all-trans β and α -carotene but not 9-cis β -carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). *J. Nutr.* **1993**, *123*, 183–191.
- Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Balasubramanyam, D.; Rengasamy, R. Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Microbiol. Res.* **2007**, *162* (2), 177–184.
- Chidambara Murthy, K. N.; Rajesha, J.; Vanitha, A.; Swamy, M. M.; Ravishankar, G. A. Protective effect of *Dunaliella salina*—A marine micro alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Hepatol. Res.* **2005**, *33* (4), 313–319.
- Chidambara Murthy, K. N.; Rajesha, J.; Swamy, M. M.; Ravishankar, G. A. Comparative evaluation of hepatoprotective activity of carotenoids of microalgae. *J. Med. Food* **2005**, *8* (4), 523–528.
- Shaish, A.; Harats, D. Therapeutic uses of *Dunaliella* powder. Patent EP1522310; JP2005097255; US2005063991, 2005.
- Ma'or, Z.; Meshulam-Simon, G.; Yehuda, S.; Gavrieli, J. A. Antiwrinkle and skin-moisturizing effects of a mineral-algal-botanical complex. *J. Cosmet. Sci.* **2000**, *51* (1), 27–36.
- Park, S. I.; Park, C. H.; Han, S. H.; Kang, H. H.; Jeong, H. J. Cosmetic composition containing algae extract for effect on improving the skin complexion. Patent WO2007078056, 2007.
- King, M. B.; Bott, T. R., *Extraction of natural products using near-critical solvents*. Blackie Academic & Professional: Glasgow, U.K., 1993.
- Ibañez, E.; Oca, A.; Murga, G. D.; López-Sebastián, S.; Tabera, J.; Reglero, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1400–1404.
- Lesellier, E.; Gurdale, K.; Tchaplá, A. Separation of cis/trans isomers of β -carotene by supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *844*, 307–320.
- Mendes, R. L.; Fernandes, H. L.; Coelho, J. P.; Reis, E. C.; Cabral, J. M. S.; Novais, J. M.; Palavra, A. F. Supercritical CO_2 extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem.* **1995**, *53* (1), 99–103.

- (28) Mendes, R. L.; Nobre, B. P.; Coelho, J. P.; Palavra, A. Solubility of β -carotene in supercritical carbon dioxide and ethane. *J. Supercrit. Fluids* **1999**, *16*, 99–106.
- (29) Mendiola, J. A.; Marín, F. R.; Hernández, S. F.; Arredondo, B. O.; Señorans, F. J.; Ibañez, E.; Reglero, G. Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1031–1038.
- (30) Gamlieli-Bonshtein, I.; Korin, E.; Cohen, S. Selective separation of cis-trans geometrical isomers of β -carotene via CO₂ supercritical fluid extraction. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80* (2), 169–174.
- (31) Herrero, M.; Jaime, L.; Martín-Alvarez, P. J.; Cifuentes, A.; Ibanez, E. Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (15), 5597–5603.
- (32) Ben-Amotz, A.; Shaish, A.; Avron, M. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.* **1989**, *91*, 1040–1043.
- (33) Raja, R.; Hema Iswarya, S.; Balasubramanyam, D.; Rengasamy, R. PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiol. Res.* **2007**, *162* (2), 168–176.
- (34) Cocero, M. J.; González, S.; Perez, S.; Alonso, E. Supercritical extraction of unsaturated products. Degradation of β -carotene in supercritical extraction processes. *J. Supercrit. Fluids* **2000**, *19*, 39–44.
- (35) Re, R.; Pellegrini, N.; Progettente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26* (9–10), 1231–1237.
- (36) Breithaupt, D. E. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chem.* **2004**, *86* (3), 449–456.
- (37) Ibañez, E.; López-Sebastián, S.; Tabera, J.; Reglero, G. Separation of carotenoids by subcritical fluid chromatography with coated, packed capillary columns and neat carbon dioxide. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823* (1–2), 313–319.
- (38) Favati, F.; King, J. W.; Friedrich, J. P.; Eskins, K. Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *J. Food Sci.* **1998**, *53* (5), 1532–1536.
- (39) Martens, H.; Næs, T. *Multivariate Calibration*; John Wiley & Sons: Oslo, Norway, 1991; p 438.
- (40) Martín, P. J., *Quimiometría alimentaria*. Ediciones Universidad Autónoma de Madrid: Madrid, Spain, 2000.
- (41) Careri, M.; Furlattini, L.; Mangia, A.; Musci, M.; Anklam, E.; Theobald, A.; von Holst, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. *J. Chromatogr. A* **2001**, *912* (1), 61–71.
- (42) Strohschein, S.; Pursch, M.; Haendel, H.; Albert, K. Structure elucidation of β -carotene isomers by HPLC-NMR coupling using a C₃₀ bonded phase. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *357* (5), 498–502.
- (43) Bononi, M.; Commissati, I.; Lubian, E.; Fossati, A.; Tateo, F. A simplified method for the HPLC resolution of α -carotene and β -carotene (trans and cis) isomers. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372* (2), 401–403.
- (44) Santos, C. A.; Vieira, A. M.; Fernandes, H. L.; Empis, J. A.; Novais, J. M. Optimisation of the biological treatment of hypersaline wastewater from *Dunaliella salina* carotenogenesis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2001**, *76* (11), 1147–1153.
- (45) Borowitzka, M. A. In *The mass culture of Dunaliella salina*, Regional Seafarming Development and Demonstration Project, Bangkok, 1990; Department, F. a. A., Ed. Food and Agriculture Organization: Bangkok, Thailand, 1990.
- (46) Herrero, M.; Ibanez, E.; Cifuentes, A.; Reglero, G.; Santoyo, S. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *J. Food Prot.* **2006**, *69* (10), 2471–2477.

Received for review April 22, 2007. Revised manuscript received October 5, 2007. Accepted October 9, 2007. This work has been financed by the Spanish Ministry of Education and Science (Projects AGL2002-04621-C02-02 and AGL2005-06726-C04-01/02). J.A.M. thanks Dr. Breithaupt for kind help with HPLC phases and the Spanish Ministry of Education for a grant. Special thanks to NBT Ltd. (Jerusalem, Israel) for the kind gift of *Dunaliella* samples.

JF0711789

Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE

Jose A. Mendiola^a, Diana García-Martínez^b, F. Javier Rupérez^b, Pedro J. Martín-Álvarez^c,
Guillermo Reglero^a, Alejandro Cifuentes^c, Coral Barbas^b,
Elena Ibañez^{c,*}, Francisco J. Señoráns^a

^a Sección Departamental Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid,
Campus de Cantoblanco, Unidad Asociada al CSIC, 28049 Madrid, Spain

^b Facultad C.C. Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo-CEU, Boadilla del Monte, 28668 Madrid, Spain

^c Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

Received 4 January 2007; received in revised form 6 July 2007; accepted 27 July 2007

Abstract

A process based on supercritical fluid extraction (SFE) at pilot scale plant has been optimized to obtain fractions highly enriched in vitamin E from microalga *Spirulina platensis*. The optimization of the main variables involved in the process (extraction pressure and temperature and extraction solvent) has been performed using a surface response methodology. A central composite circumscribed design (CCCD) was employed to study the vitamin E enrichment (in mg/g extract). The parameters of the model were estimated by multiple linear regression (MLR) providing a mathematical model able to predict the concentration of vitamin E as a function of extraction pressure and temperature when neat CO₂ was used as extractant. The estimated model demonstrated that the extraction temperature, the quadratic term of temperature, the extracting pressure and the interaction pressure \times temperature had a significant effect on the final concentration of vitamin E in the extracts. The optimal conditions for the extraction of vitamin E from *Spirulina platensis* were achieved working at maximum temperatures being the optimum value predicted 29.4 mg/g extract which implies a tocopherol enrichment of more than 12 times the initial concentration of tocopherol in the raw material.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: SFE; Vitamin E; Tocopherol; Microalga; *Spirulina platensis*; Experimental design; Optimization

1. Introduction

Tocopherols (vitamin E) are lipid-soluble antioxidants synthesized only by photosynthetic organisms [1,2]. These are present as constituents of unsaponifiable matter and may occur together with phospholipids, carotenoids, chlorophylls and triterpenyl alcohols.

Natural antioxidants are receiving an increasing attention in food science because of the reports that state that diets rich in plant antioxidants derived from fruits and vegetables are associated with lower risks of coronary heart disease and cancer [3,4]. Furthermore, recent reports have been published suggesting that naturally occurring homologous mixture has a more beneficial effect than the intake of synthetically produced vitamin E [5]; this fact being probably related to the absence of non-active stereoisomers [6] in synthetic products. Therefore,

the importance of finding out natural sources of antioxidants is increasing with recent reports on the interest of some microalgae such as *Spirulina platensis*, which is said to be a recent re-discovery to the modern world as it shows several health effects [7]. As for its composition, *S. platensis* can be considered a natural source of therapeutical compounds since it has been described as containing significant amounts of β -carotene [8], inositol, niacin and polyunsaturated fatty acids such as γ -linolenic acid [9] and eicosapentaenoic acid [10], among others. As for the α -tocopherol content in *Spirulina*, previous work done in our research group has demonstrated the low concentrations found in raw *Spirulina* [11], with values ranging from 0.011 to 0.014 mg tocopherol/g dried *Spirulina*.

One of the most important techniques for tocopherol extraction and isolation is supercritical fluid extraction (SFE) that has been applied, for example, to extract and concentrate tocopherols from different sources such as palm oil [12] and rice bran or soybean [13] with results providing enrichment factors up to four times the enrichment achieved when extracting with organic solvents. Recent studies have been published dealing with the

* Corresponding author. Tel.: +34 91 562 2900x388; fax: +34 91 564 4853.
E-mail address: elena@ifi.csic.es (E. Ibañez).

purification of tocopherols from crude palm oil (CPO) and soy oil deodorizer distillate (SODD) [14]. In this study, after phase equilibrium measurements, experimental verification was done at pilot scale providing extracts with a 10-fold increase in tocopherol concentration when using CPO and enrichments up to 94% when using SODD with a two-step process by recirculating the top-phase product obtained in the first-step extraction. Other products and residues that have also been studied include wheat germ [15,16]; and olive tree leaves [17].

On the other hand, SFE is a well-recognized process to be held at preparative and industrial scale and it has been previously used to extract interesting compounds from microalgae [18,19], with values ranging from 0.011 to 0.014 mg tocopherol/g dried *Spirulina*.

The objective of the present work was to optimize a supercritical fluid extraction process, at pilot scale, to concentrate vitamin E from microalga *S. platensis*. Several factors have been selected to optimize the process (using a surface response methodology) such as the extraction pressure and temperature and the polarity of the extraction solvent. Experimental designs have been widely used to optimise complex processes where several factors are involved; as for response surface designs, they have been employed for optimization in several fields such as enzymatic catalysis, microorganisms growth, analytical processes, polymerization processes and sub- and supercritical fluid extractions [20–25]. Through the optimization we aim to obtain information about the optimum conditions to perform the process and also to find mathematical models able to properly predict the behavior of the system.

2. Materials and methods

2.1. Samples and chemicals

Microalgae samples (*S. platensis*) consisted of air-dried microalgae with 6% moisture mass, from Algamar (Pontevedra, Spain), stored under dry and dark conditions.

CO₂ (N-38 quality) was obtained from Air Liquide España S.A. (Madrid, Spain) and ethanol from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain).

2.2. Extraction method

All extractions were carried out in a pilot-scale plant for supercritical fluid extraction (Iberfluid, Spain) with a 285 ml extraction cell, previously described [26]. The extraction cell was made of 316 stainless steel and was equipped with a 0.5 μm frit at the inlet and a 2 μm frit at the outlet. All extractions were done using a flow of 3 l/h and ~3.17 kg/h. The extraction pressure was controlled by micrometering valves, and the carbon dioxide pump was from Dosapro (France). Fractionation was achieved in two different separators, with independent control of temperature and pressure, by a decrease in pressure.

For each experiment, the extraction cell was filled with 75 g of microalgae (30–70 μm trichome length) and 120 g of washed sea sand (0.25–0.30 mm diameter, Panreac, Barcelona, Spain). The extraction conditions (extraction pressure and temperature) were selected for the experimental design. Cascade fractionation was achieved by setting pressures in separators 1 and 2 equal to 50% of the extraction pressure in the column and 50% of the pressure in separator 1 (with a maximum of 55 bar), respectively. Temperatures in separators 1 and 2 were fixed equal to the extraction temperature and 20 °C, respectively. The total extraction time was 75 min for all the experiments.

As for the extractions using ethanol as modifier, the addition started after having reached the selected pressure during 75% of the extraction time. Ethanol was added in an amount corresponding to 10% of CO₂ (v/v). As can be seen in the pilot plant scheme depicted in Señorán et al. [26], the addition of co-solvent is performed previous to the CO₂ pump. That means that the ratio CO₂:ethanol is the same in all experiments where ethanol is present (90:10), although the composition of phases at working conditions may vary [27], as shown in Table 1.

All extracts were kept under N₂, at –20 °C in the dark, and ethanol, when present as modifier, was eliminated at 35 °C in a vacuum rotary evaporator.

2.3. Experimental design

The effects of two factors, pressure (*P*) and extraction temperature (*T*), on the concentration of vitamin E, for each solvent

Table 1
Experimental matrix design and results obtained for the concentration of vitamin E for the two solvents studied

Experiment	Temperature (°C)	Pressure (bar)	CO ₂ density (g/ml)	CO ₂		CO ₂ :EtOH		
				Yield%	Vitamin E (mg/g extract)	Yield%	Vitamin E (mg/g extract)	CO ₂ % (w/w) ^a
1	55	220	0.781	0.25	3.15	3.4	2.70	90.0
2	55	220	0.781	0.58	3.25	2.32	1.79	90.0
3	83.3	220	0.618	0.62	31.61	1.52	5.43	87.6
4	55	361.4	0.888	0.60	5.15	5.1	0.88	91.1
5	75	120	0.318	0.62	11.15	4.55	1.70	78.5
6	26.7	220	0.92	0.39	6.02	3.09	2.41	91.3
7	75	320	0.785	0.85	16.06	4.21	3.13	90.0
8	35	320	0.94	0.65	3.8	2.63	2.02	91.5
9	55	78.6	0.195	0.43	1.1	8.08	0.49	69.1
10	35	120	0.768	0.66	3.05	4.16	2.84	89.8

^a Measured at working conditions, always feed in volume: 2.7 l/h CO₂ + 0.3 l/h EtOH

utilized, were studied using a central composite circumscribed design. A total of 10 experiments: four points of a full factorial design, four star points ($\alpha = 1.414$ star distance), and two center points to estimate the experimental errors, were carried out in randomized run order. By using this design, the two variables were tested at five different experimental levels: pressure at 78.6, 120, 220, 320 and 361.4 bar, and extraction temperature at 26.7, 35, 55, 75 and 83.3 °C, in correspondence with the coded levels: -1.414 , -1 , 0 , $+1$, $+1.414$, respectively. The response variables selected were the concentration of vitamin E, for each solvent utilized (CO_2 and CO_2 and ethanol). Table 1 shows the experimental matrix design, with the experimental levels of the independent variables (factors), along with the results obtained for the response analyzed variables. The quadratic polynomial model proposed for each response variable (Y_i) was:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 T + \beta_{1,1} P^2 + \beta_{2,2} T^2 + \beta_{1,2} PT + \varepsilon \quad (1)$$

where β_0 is the intercept; β_1 and β_2 the linear coefficients; β_{11} and β_{22} the squared coefficients; β_{12} the interaction coefficient; and ε is the error variable. The parameters of the model were estimated by multiple linear regression (MLR) using the Statgraphics Plus v.5.1 program (Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., MD, USA, 2000). This program permits the creation and analysis of experimental designs.

The effect of the each term in the model and their statistical significance, for each of the response variables, was analyzed from the standardized Pareto chart. The terms not significantly different from zero ($P > 0.10$), were excluded of the model and the mathematical model was re-fitted by MLR. The goodness of fit of the model was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and the residual standard deviation (R.S.D.). From the new fitted models, the contour plot of response surface and the optimum conditions, that maximized each of the responses variables, were obtained.

2.4. Tocopherol analysis

The method used in the present work to measure tocopherol content in *Spirulina* supercritical extracts was adapted from a method previously developed and validated by Gómez-Coronado and Barbas [28] and has been previously described elsewhere [11]. Briefly, the method employed is described.

2.4.1. Stock and working standards

Individual stock solutions of about 9 mg/ml of α - and γ -tocopherol as external standards and a stock solution of 2 mg/ml tocopherol as internal standard were prepared in ethanol. These solutions were stored in aluminium foil-covered containers and kept at -20°C . The day of the assay, the exact concentration of α - and γ -tocopherol was determined spectrophotometrically in an ethanol dilution 1/250 (v/v). Lectures were obtained at 295 nm for α -tocopherol ($\varepsilon = 3058 \text{ l/mol cm}$) and at 298 nm for γ -tocopherol ($\varepsilon = 3810 \text{ l/mol cm}$). Meanwhile dilutions in acetone 1/6 (v/v) of α -tocopherol, 1/800 of γ -tocopherol and 1/15 of tocol from the corresponding stocks were prepared. Finally working standards consisted of a mixture of 200 μl of diluted

tolcol and 300 μl of each diluted tocopherol made up with acetone to a final volume of 4 ml in glass tubes. These solutions were probe sonicated and centrifuged to follow the same procedure as with samples.

2.5. Sample treatment

250 mg of the microalgae extracts were weighed in a glass tube and 200 μl of diluted tocol as internal standard (0.13 mg/l) and 3.8 ml of acetone were added. Samples were extracted by probe sonication for 1 min, centrifuged and filtered through 0.45 μm nylon filters to HPLC vials.

2.5.1. Chromatographic conditions

The chromatographic system was a Beckman (Fullerton, CA, USA) HPLC system equipped with a 125 pump, an automatic injector (507e), a 168 diode array detector, a Gold System data processor, and an analogue interface (406) for the fluorescence detector from Waters (Milford, MA, USA). Chromatographic analysis was performed on a 5 μm particle Discovery[®] C18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) column (25 cm \times 0.46 cm) kept in a Bio-Rad (Hercules, CA, USA) column oven at 35 °C. A C18 pre-column was used to protect the column from less polar compounds.

Purified-for-HPLC water (Milli-Q system, Millipore, Billerica, MA, USA) was employed as mobile phase A and acetonitrile–methanol (70:30, v/v) with 0.1% (v/v) of acetic acid added as mobile phase B. From $t = 0$ to $t = 24$ min the eluent composition varied in a linear gradient from 85 to 100% B at a flow rate of 2 ml/min. At $t = 24$ min the flow was increased to 3 ml/min in 1 min to clean the column of less polar compounds. At $t = 35$ min the system returned to initial conditions in 1 min which marked the end of the run. α -Tocopherol was detected by absorbance at 295 nm and of both tocopherols by fluorescence exc: 295 nm; em: 350 nm.

Peak identification was performed comparing the retention times with pure standards, and confirmed with characteristic spectra obtained from the photodiode array detector, which also permitted the confirmation of the purity of the peaks.

3. Results and discussion

The experimental values of the factors were selected to cover a wide range of conditions, as shown in Table 1, always considering the experimental limitations of the pilot scale plant used in this study and previous data published for the extraction of valuable compounds from microalgae [18,29–35]. Extraction pressures ranged from 78 to 361 and extraction temperatures between 26 and 83 °C, which imply using densities from 0.195 to 0.94 g/ml. As mentioned, the experimental design was done twice, using pure CO_2 and CO_2 plus 10% ethanol as modifier. Using modifiers allows increasing the polarity of the extracting agent while changing the viscosity of the fluid. Sometimes a two-phase system is obtained (as in the present work when using 78 bar and 55 °C) which allows simultaneously liquid and supercritical extraction.

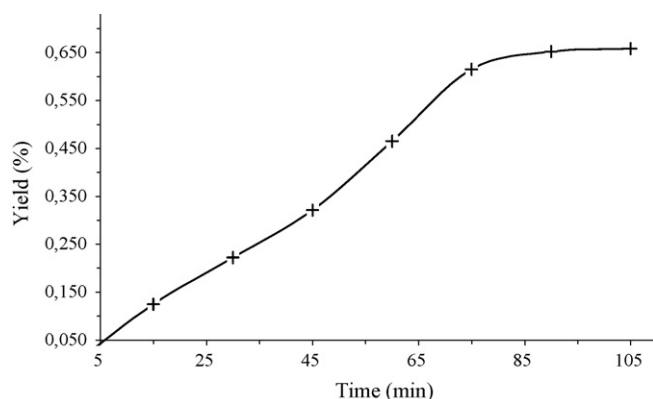


Fig. 1. Extraction yield (% dry weight) vs. extraction time at the central point of the design (220 bar and 55 °C, using CO₂ as extracting agent).

Extraction time was fixed previously through sequential extractions of the same sample at selected conditions (central point of the design, that is, 220 bar and 55 °C without modifier). The extraction time was set at the beginning of the asymptotic curve yield (%)–time (min), that is, 75 min. Fig. 1 shows the evolution of the yield versus extraction time at the extraction conditions tested.

3.1. Effect of the factors

As mentioned in Section 2, Table 1 lists the values of the concentration of vitamin E obtained for all the experiments corresponding to the matrix design for both solvents employed (CO₂ and ethanol). MLR was applied to estimate the parameters of the proposed model in Eq. (1) for each of the two response variables. Fig. 2 shows the standardized Pareto charts for each of the two responses, illustrating the importance and the statistical significance of the different terms in the model. The effects (computed as twice the MLR coefficients for centered and scaled factors) are plotted sorted (in absolute value) in descending. It can be easily seen that the terms, significantly different from zero ($P < 0.10$), that have the strongest influence in the response variable, for CO₂, are the extraction temperature (T) and its quadratic term (T^*T), both having a positive effect

Table 2

Regression coefficients, for unscaled factors, and statistics for the fit, obtained from MLR

Terms of the model	Concentration of vitamin E (mg/g extract)	
	Solvent: CO ₂	Solvent: CO ₂ and ethanol
Constant	36.358	3.393
P	0.0142	0.034
T	−1.700 [‡]	−0.212
$P \times P$		−0.0001
$T \times T$	0.0187 [‡]	0.0022 [‡]
$P \times T$		
Statistics for goodness of fit of the model		
R^2	0.94	0.76
R.S.D.	2.87	0.90

R^2 , determination coefficient; R.S.D., residual standard deviation.

[‡] Regression coefficient significant different from zero ($P < 0.01$).

(Fig. 2). Considering as extracting solvent CO₂ + ethanol, only the quadratic term (T^*T) was significantly different from zero ($P < 0.10$). Results obtained are in agreement with some studies done previously by other authors extracting vitamin E from black sesame seeds by SFE [36]. These authors also found that temperature was the factor that mostly influences the recovery of vitamin E while CO₂ flow rate was not significant (at the experimental conditions tested). These results are in accordance with the statement that tocopherol is an easily extractable compound [13]. Since the temperature affects positively the extraction of vitamin E, it is reasonable to think that its extraction will be favored by high-extraction temperatures. Several references can be found in the literature that use temperatures up to 80 and 90 °C for extraction of vitamin E from soybean flakes [13] and palm leaves [12], respectively. A recent work done by Skerget et al. [37] provided data for phase equilibria of the binary system α -tocopherol–CO₂ at different pressures and temperatures up to 80 °C; results showed that the solubility of the α -tocopherol in the light phase increase with pressure and temperature being maximum at 80 °C.

From the statistical significance of the estimated regression coefficients, the terms of the model not significantly different

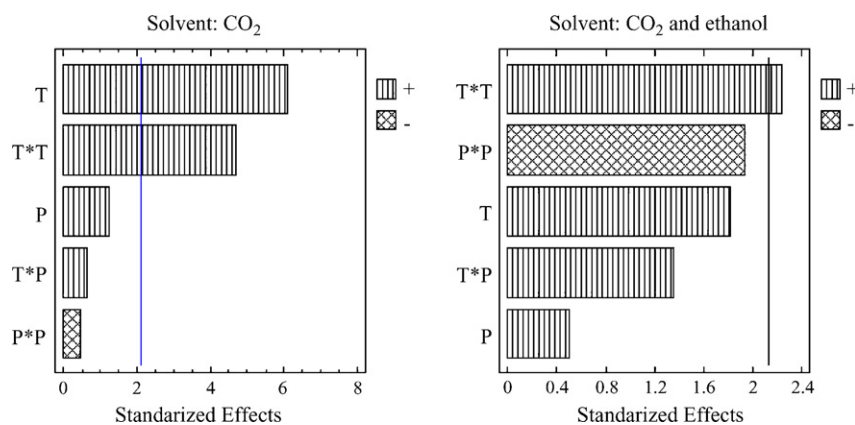


Fig. 2. Standardized Pareto chart plot with the effect of each term in the model divided by its standard error, for the two response variables. The vertical line in the chart tests the significance of the effects at 90% confidence level. Legend for the bars corresponding to the terms in the model (T =extraction Temperature, P =extraction Pressure).

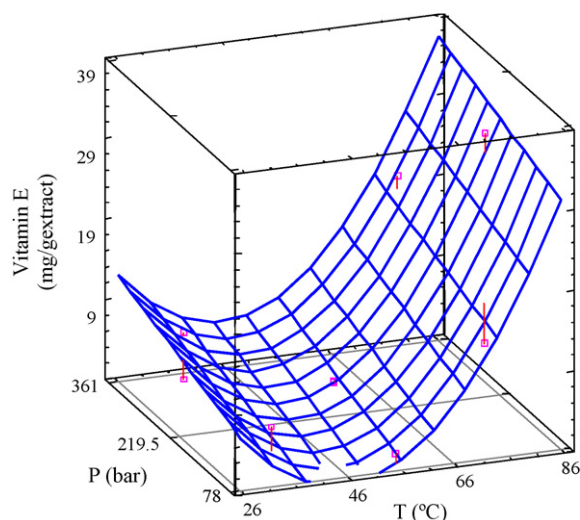


Fig. 3. Surface plot of the response variable (vitamin E in mg/g extract) for CO₂.

from zero ($P > 0.10$) were excluded from Eq. (1) and the mathematical model was refitted by MLR. The new results are listed in Table 2, including the regression coefficients, for unscaled factors, R^2 and R.S.D. From these results, the following conclusions can be drawn: the model was found adequate enough to describe the data only when CO₂ was employed as extracting agent; in this particular case, the fraction of variation of the response variable explained by the model (R^2) was superior to 94%. When considering CO₂ + ethanol, no model was really found, with R^2 equal to 76%. Therefore, no further statistical study was done for this extracting solvent.

Fig. 3 shows the surface of the response variable, for CO₂, as a function of pressure and temperature. By analyzing the plot it can be seen that the maximum tocopherol extraction can be found working at high temperatures and high pressures, although pressure does not have a statistically significant effect on the response. The optimum conditions of the extraction process, provided by the statistical program, are equal to the maximum pressure and temperature tested, that is, 83 °C and 362 bar. The predicted value for vitamin E concentration (mg/g extract) at the optimum equal to 29.4 mg/g extract. Considering at this conditions an extraction yield equal to 0.53% (that corresponds to the maximum extraction yield obtained at 362 bar and 55 °C which are the closest experimental conditions), the concentration of vitamin E per gram of *Spirulina* equals to 0.155, meaning an enrichment factor of 12 compared to the initial concentration in raw *Spirulina* (that, as mentioned before, ranged from 0.011 to 0.014 mg α -tocopherol/g dried microalgae [11]).

One important aspect to be considered is the chemical composition of the raw material to be extracted. For example, it has been widely described [17,37] that tocopherol enrichment is related to the extraction capabilities of other matrix compounds since a competitive extraction of other diluting materials can occur at higher pressures. This statement is true when tocopherols are found along with other oil components, such as glycerides, pigments and free fatty acids which are more easily soluble at high pressures and medium-low temperatures; in this particular case, an increase in the extraction pressure leads to a

dilution of the product (and therefore to a lower concentration of tocopherols). Nevertheless, in the present work, maximum pressure and temperature are suggested as being the optimal for the enrichment process since at these conditions, a significant decrease in density can be observed that precludes the extraction of low-polar compounds such as carotenoids and/or fatty acids. Considering that the extraction pressure is not the most important factor in the extraction of vitamin E, the mathematical model was used to predict the vitamin E concentration that could be obtained if pressure decreased from the optimum (361 bar) to lower values keeping temperature to the optimum value, that is, 83.3 °C. Thus, considering a pressure equal to 320 bar, the predicted value equal to 28.8 mg α -tocopherol/g extract while a decrease to 220 bar imply a predicted concentration equal to 27.4 mg α -tocopherol/g extract and a further decrease to 120 bar, a concentration of 25.9 mg α -tocopherol/g extract. Considering the R.S.D. provided by the model, no significant difference was observed between the concentration of vitamin E at the optimum and at the different extraction pressures considered. Obviously, from the economic point of view there is a big increase in investment of apparatus and processing cost with the growth of the extraction pressure. Finally, working at 220 bar and 83.3 °C would allow an enrichment of vitamin E of about 8 times, considering an extraction yield of 0.4% (which is the experimental value obtained at these conditions).

4. Conclusions

In the present work, a process based on SFE at pilot scale plant was optimized to obtain fractions highly enriched in vitamin E from microalgae *Spirulina platensis*. By means of a central composite circumscribed design (CCCD), it was possible to study and estimate the concentration of vitamin E as a function of extraction pressure and temperature, when neat CO₂ was used as extracting agent, providing as optimal conditions 361 bar and 83.3 °C. At the optimum, the predicted value was 29.4 mg/g extract, which implies a tocopherol enrichment of more than 12 times the initial concentration of tocopherol in the raw material.

Acknowledgements

This work has been financed by Spanish Ministry of Education (Project AGL2002-04621-C02-01/02 and AGL2005-06726-C04-01/02/03). J.A. Mendiola and D. García-Martínez thank MEC for a FPI grant.

References

- [1] G. Schultz, A. Heintze, P. Hoppe, P. Hagelstein, J. Grolach, K. Meereis, U. Schwanke, M. Preiss, Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism, in: Proceedings of the 6th Annual Penn State Symposium in Plant Physiology, American Society of Plant Physiologists, University Park, Pennsylvania, 1991.
- [2] A.N. Yerin, A.Y. Kormanovskii, I.I. Ivanov, Localization of α -tocopherol in chloroplasts, *Biophysics* 29 (1984) 363–364.
- [3] A. Harris, S. Devaraj, I. Jialal, Oxidative stress, α -tocopherol therapy, and atherosclerosis, *Curr. Atheroscler. Rep.* 4 (2002) 373–380.

- [4] R. Brigelius-Flohe, F.J. Kelly, J.T. Salonen, J. Neuzil, J.-M. Zingg, A. Azzi, The European perspective on vitamin e: current knowledge and future research, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 703–716.
- [5] National Institute for Health, Facts About Dietary Supplements—Vitamin E. 2002, Warren Grant Magnuson Clinical Center, Maryland, 2002.
- [6] R. Brigelius-Flohe, M.G. Traber, Vitamin E: function and metabolism, *FASEB J.* 13 (1999) 1145–1155.
- [7] DiciS Spirulina: therapeutic effects [Web Page] [cited; available from: <http://www.dic.co.jp/eng/products/lina/index.html>].
- [8] R. Kapoor, U. Mehta, Utilization of Beta-Carotene from Spirulina Platensis by Rats, vol. 43, *Plant Foods For Human Nutrition*, Dordrecht, Netherlands, 1993, pp. 1–7.
- [9] G. Mahajan, M. Kamat, Γ -Linolenic acid production from spirulina platensis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 (1995) 466–469.
- [10] Z. Cohen, S. Didi, Y.M. Heimer, Overproduction of gamma-linolenic and eicosapentaenoic acids by algae, *Plant Physiol.* 98 (1992) 569–572.
- [11] D.J.M. Gomez-Coronado, E. Ibanez, F.J. Ruperez, C. Barbas, Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 227–233.
- [12] A. Birtigh, M. Johannsen, G. Brunner, N. Nair, Supercritical-fluid extraction of oil-palm components, *J. Supercrit. Fluids* 8 (1995) 46–50.
- [13] J.W. King, F. Favati, S.L. Taylor, Production of tocopherol concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography, *Sep. Sci. Technol.* 31 (1996) 1843–1857.
- [14] K. Gast, M. Jungfer, C. Saure, G. Brunner, Purification of tocopherols from edible oil, *J. Supercrit. Fluids* 34 (2005) 17–25.
- [15] A. Molsa, Quality of wheat germ oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 969–974.
- [16] Y. Ge, Y. Ni, H. Yan, Y. Chen, T. Cai, Optimization of the supercritical fluid extraction of natural vitamin E from wheat germ using response surface methodology, *J. Food Sci.* 67 (2002) 239–243.
- [17] A. de Lucas, E. Martinez de la Ossa, J. Rincon, M.A. Blanco, I. Gracia, Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves, *J. Supercrit. Fluids* 22 (2002) 221–228.
- [18] M. Careri, L. Furlattini, A. Mangia, M. Musci, E. Anklam, A. Theobald, C. von Holst, Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in spirulina pacifica algae: a chemometric approach, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 61–71.
- [19] M.F. Mendes, F.L.P. Pessoa, A.M.C. Uller, an economic evaluation based on an experimental study of the vitamin e concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO₂, *J. Supercrit. Fluids* 23 (2002) 257–265.
- [20] R.H. Myers, A.I. Khuri, W. Carter Jr., Response surface methodology: 1966–1988, *Technometrics* 31 (1989) 137–157.
- [21] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [22] D.M. Steinberg, W.G. Hunter, Experimental design: review and comment, *Technometrics* 26 (1984) 71–130.
- [23] M.K.L. Bicking, T.G. Hayes, J.C. Kiley, S.N. Deming, Experimental design approach to the optimization of supercritical fluid extraction for the determination of oil and grease in soil, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 170–176.
- [24] M. Herrero, L. Jaime, P.J. Martin-Alvarez, A. Cifuentes, E. Ibanez, Optimization of the Extraction of Antioxidants from Dunaliella Salina Microalga by Pressurized Liquids, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5597–5603.
- [25] M. Herrero, P.J. Martin-Alvarez, F.J. Senorans, A. Cifuentes, E. Ibanez, Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina Platensis* microalga, *Food Chem.* 93 (2005) 417–423.
- [26] F.J. Señorans, E. Ibáñez, S. Cavello, J. Tabera, G. Reglero, Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 491–499.
- [27] S.N. Joung, C.W. Yoo, H.Y. Shin, S.Y. Kima, K. Yoo, C.S. Lee, W.S. Huhe, Measurements and correlation of high-pressure vlc of binary CO₂–alcohol systems (methanol, ethanol, 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol), *J. Fluid Phase Equilib.* 185 (2001) 219–230.
- [28] D.J.M. Gómez-Coronado, C. Barbas, Optimised and validated hplc method for α - and Γ -tocopherol measurement in *Laurus Nobilis* leaves. New data on tocopherol content, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5196–5201.
- [29] M.J. Cocero, S. Ferrero, Crystallization of β -carotene by a gas process in batch. Effect of operating conditions, *J. Supercrit. Fluids* 22 (2002) 237–245.
- [30] M.J. Cocero, S. González, S. Perez, E. Alonso, Supercritical extraction of unsaturated products. Degradation of β -carotene in supercritical extraction processes, *J. Supercrit. Fluids* 19 (2000) 39–44.
- [31] R.L. Mendes, B.P. Nobre, M.T. Cardoso, A.P. Pereira, A.F. Palavra, Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae, *Inorg. Chim. Acta* 356 (2003) 328–334.
- [32] R.L. Mendes, B.P. Nobre, J.P. Coelho, A. Palavra, Solubility of β -carotene in supercritical carbon dioxide and ethane, *J. Supercrit. Fluids* 16 (1999) 99–106.
- [33] A. Robles Medina, E. Molina Grima, A. Giménez Giménez, M.J. Ibáñez González, Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids, *Biotechnol. Adv.* 16 (1998) 517–580.
- [34] H. Sovová, R.P. Stateva, A.A. Galushko, Solubility of β -carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers, *J. Supercrit. Fluids* 21 (2001) 195–203.
- [35] P. Subra, S. Castellani, P. Jestin, A. Aoufi, Extraction of β -carotene with supercritical fluids. Experiments and modelling, *J. Supercrit. Fluids* 12 (1998) 261–269.
- [36] Q. Hu, J. Xu, S. Chen, F. Yang, Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 943–947.
- [37] M. Skerget, P. Kotnik, Z. Knez, Phase equilibria in systems containing [alpha]-tocopherol and dense gas, *J. Supercrit. Fluids* 26 (2003) 181–191.